



TECHNISCHE UNIVERSITÄT
CAROLO-WILHELMINA
ZU BRAUNSCHWEIG

Metabolomanalyse von
Corynebacterium glutamicum* und *Pseudomonas aeruginosa
unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Eliane Lilienne Aylin Frimmersdorf
aus Köln

1. Referent: Professor Dr. Dietmar Schomburg
2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 10.02.2010
mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.04.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Eliane Frimmersdorf, Sebastian Buchinger, Dietmar Schomburg. Metabolic response to environmental perturbation. CUBIC – Cologne University Bioinformatics Center, Berlin (2007).

Eliane Frimmersdorf, Sebastian Buchinger, Dietmar Schomburg. Network construction with metabolomics. CUBIC – Cologne University Bioinformatics Center, Berlin (2007).

Michael Eiden, Silke Schrader, Eliane Frimmersdorf und Dietmar Schomburg. A novel approach for system biology of *Corynebacterium glutamicum* by combining lab data with in-depth bioinformatics data. GCB – German Conference on Bioinformatics, Potsdam (2007).

Eliane Frimmersdorf, Sebastian Buchinger, Dietmar Schomburg. Metabolic response to environmental perturbation. European BioPerspectives, Köln (2007).

Eliane Frimmersdorf, Sebastian Buchinger, Dietmar Schomburg. Metabolic response to environmental perturbation. ProkaGENOMICS, Göttingen (2007).

Eliane Frimmersdorf, Sonja Horatzek, Lutz Wiehlmann, Kerstin Schreiber, Dietmar Schomburg. Metabolome analysis for characterization of *Pseudomonas aeruginosa*. Trends in metabolomics, Frankfurt (2008).

Isam Haddad, Karsten Hiller, Eliane Frimmersdorf, Beatrice Benkert, Max Schobert, Dietmar Schomburg und Dieter Jahn. eSOMet: A novel tool for highly reliable biomarker identification. International Conference on Systems Biology (ICSB), Göteborg (2008).

Eliane Frimmersdorf, Sonja Horatzek, Lutz Wiehlmann, Kerstin Schreiber, Dietmar Schomburg. Metabolome analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. European BioPerspectives, Hannover (2008).

Sonja Horatzek, Eliane Frimmersdorf, Lutz Wiehlmann, Dietmar Schomburg, Burkhard Tümmler. Metabolic impact on virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Pseudomonas 2009, Hannover (2009)

Eliane Frimmersdorf, Lutz Wiehlmann, Eva Jordan, Kerstin Schreiber, Dietmar Schomburg. Metabolome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* using gaschromatography-mass spectrometry. Pseudomonas 2009, Hannover (2009).

*Jeder, der sich die Fähigkeit erhält,
Schönes zu erkennen, wird nie alt werden.*

FRANZ KAFKA

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Systembiologie.....	1
1.2	Metabolomanalyse (Metabolomics).....	2
1.2.1	Fließschema einer Standard-Metabolom-Analyse.....	3
1.2.1.1	Probennahme und Metabolitextraktion.....	4
1.2.1.2	Chemische Analyse via NMR, GC-MS und LC-MS.....	5
1.2.1.3	Metabolit-Identifizierung und -Quantifizierung.....	6
1.2.1.4	Chemometrische Datenanalyse und Statistik.....	6
1.2.2	Gaschromatographie – Massenspektrometrie.....	7
1.3	Modellorganismus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	9
1.4	Modellorganismus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.4.1	<i>P. aeruginosa</i> als opportunistisches Pathogen.....	13
1.4.1.1	Cystische Fibrose (Mukoviszidose).....	14
1.4.1.2	Phänotypische Variationen von <i>P. aeruginosa</i> bei Cystischer Fibrose.....	15
1.4.2	Quorum Sensing bei <i>P. aeruginosa</i>	16
1.5	<i>C. glutamicum</i> & <i>P. aeruginosa</i> : Energiestoffwechsel im Vergleich.....	18
1.6	Fermentation.....	21
1.6.1	Fermenter.....	21
1.7	Ziele der Arbeit.....	24
2	Material & Methoden.....	25
2.1	Verwendete Chemikalien, Geräte, Materialien, Software und Datenbanken.....	25
2.2	Medien, Puffer und Lösungen.....	27
2.2.1	Undefinierte Medien.....	27
2.2.1.1	Brain Heart Infusion (BHI) Medium.....	27
2.2.1.2	Luria-Bertani (LB)-Medium (1L).....	27
2.2.1.3	Trypton-Medium (1L).....	27
2.2.1.4	Caseinaminosäure-Lösung (0.25% bzw. 1%).....	27
2.2.2	Allgemeine Lösungen.....	27
2.2.2.1	Biotin-Stammlösung.....	28
2.2.2.2	Natriumchlorid-Lösung (9%).....	28
2.2.2.3	Ribitol.....	28
2.2.2.4	Methylnonadecanoate.....	28
2.2.2.5	Alkanmix	28
2.2.2.6	Spurensalzlösung für MM1-Medium.....	29
2.2.2.7	Spurensalzlösung für A10-Medium.....	29
2.2.3	Minimalmedien (MM).....	29

2.2.3.1	MM1-Grundstamm-Medium.....	29
2.2.3.2	Fermentationsmedium.....	30
2.2.3.3	AB-Medium.....	30
2.2.3.4	A10-Lösung.....	30
2.3	Bakterienstämme.....	31
2.4	Kultivierung von Mikroorganismen.....	31
2.4.1	Bestimmung der Bakteriendichte.....	31
2.4.2	Bestimmung des spezifischen Wachstums.....	31
2.4.3	<i>C. glutamicum</i>	32
2.4.3.1	Ausstrich auf Platten.....	32
2.4.3.2	BHI-Kultur.....	32
2.4.3.3	Übernachtskultur.....	32
2.4.3.4	Hauptkultur.....	32
2.4.3.5	Fermentation.....	33
	Vorbereitung des Fermenters.....	33
	Fermentationsparameter.....	33
	Animpfen des Fermenters.....	33
2.4.4	<i>P. aeruginosa</i>	34
2.4.4.1	Ausstrich auf Platten.....	34
2.4.4.2	Übernachtskultur	34
2.4.4.3	Hauptkultur	34
2.5	Probenvorbereitung und Metabolitextraktion.....	34
2.5.1	Zellernte.....	34
2.5.1.1	Fermenter.....	34
2.5.1.2	Kolben.....	35
2.5.2	Zellaufschluss	35
2.5.3	Metabolitextraktion.....	35
2.5.3.1	Hydrophile Phase.....	35
2.5.3.2	Hydrophobe Phase.....	35
2.5.4	Derivatisierung.....	37
2.5.4.1	Hydrophile Phase	37
2.5.4.2	Hydrophobe Phase.....	37
2.6	GC-MS - Messung.....	37
2.7	Nachprozessierung und Auswertung der GC-MS Chromatogramme.....	39
2.7.1	Identifizierung.....	39
2.7.1.1	Amdis32 & XCalibur.....	40
2.7.1.2	Validierung der Annotationen von <i>C. glutamicum</i> und <i>P. aeruginosa</i>	41
2.8	Chemometrische Datenanalyse und Statistik.....	42
2.8.1	Fehlerrechnung.....	42

2.8.2	CUMETA - CUBIC Metabolome Data Analysis Tools.....	43
2.8.3	eSOMet (emergent self-organizing maps).....	43
2.8.4	Varianzanalyse (ANOVA).....	44
2.8.5	Hauptkomponentenanalyse PCA (Principal Component Analysis).....	44
2.8.6	Hierarchische Cluster Analyse (HCA).....	45
2.8.7	T-Test-Analyse.....	45
2.8.8	Ergänzende Tools.....	46
2.9	Transkriptomanalyse.....	47
2.9.1	Herstellung der RNA und cDNA.....	47
2.9.2	Microarray Daten Analyse.....	47
3	Ergebnisse & Diskussion.....	48
3.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	49
3.1.1	Wachstumsverhalten von <i>C. glutamicum</i> auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	49
3.1.2	Grundlegende Beschreibung der Metabolomanalysen der Quinat- und Glucose-Fermentation.....	56
3.1.2.1	Glucose-Fermentation.....	57
3.1.2.2	Quinat- Fermentation.....	59
3.1.3	Metabolische Profile von <i>C. glutamicum</i> bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen im Vergleich.....	61
3.1.3.1	Vergleich der Metabolitkonzentrationen der Quinat- und Glucose-Fermentation in der exponentiellen Wachstumsphase.....	67
3.1.3.2	Vergleich der Metabolitkonzentrationen von sechs Fermentationen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen im exponentiellen Wachstum.....	73
3.1.4	<i>C. glutamicum</i> bei Wachstum auf Quinat mit variiertem Sauerstoffpartialdruck.....	76
3.1.5	Grundlegende Beschreibung der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck.....	82
3.1.6	Einfluss des Sauerstoffpartialdruckes des Kulturmediums auf das Metabolom von <i>C. glutamicum</i>	85
3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92
3.2.1	Charakteristiken der Referenzstämme PAO1, TBCF10839 sowie PA14 bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	92
3.2.2	Metabolische Profile der Referenzstämme PAO1, TBCF10839 und PA14 bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	98
3.2.2.1	Trypton, Caseinaminosäuren.....	98
3.2.2.2	Cadaverin.....	105
3.2.2.3	Glucose.....	107
3.2.2.4	Glucose-Methionin.....	108
3.2.2.5	Citrat.....	113
3.2.2.6	Succinat.....	116

3.2.3	Charakteristiken der <i>P. aeruginosa</i> -Transposonmutanten	119
3.2.3.1	Grundlegende Beschreibungen der Metabolomdaten der <i>P. aeruginosa</i> - Transposonmutanten.....	121
3.2.3.2	Metabolische Profile der Transposonmutante PA5349 bei Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.....	127
3.2.3.3	Trypton.....	127
3.2.3.4	Glucose.....	129
3.2.3.5	Citrat.....	132
3.2.3.6	Succinat.....	136
3.2.3.7	Cadaverin.....	143
3.2.4	Etablierung der Extraktionsmethode der hydrophoben Phasenseparation an <i>P. aeruginosa</i>	150
3.2.4.1	Vergleich hydrophober Metabolite der TM PA5349 mit dem TBCF10839	152
3.2.5	Etablierung von Wachstumsbedingungen von Cystische Fibrose- Isolaten auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.....	156
3.2.5.1	Wachstumsverhalten auf Caseinaminosäure-Medium.....	157
3.2.5.2	Wachstumsverhalten auf Glucose-Methionin-Medium.....	159
3.2.6	Metabolische Profile von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten aus Cystische Fibrose Patienten bei Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.....	162
3.2.6.1	Metabolische Profile von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten von Patient 1 im Vergleich zu PA14 bei Wachstum auf CasAA	164
3.2.6.2	Metabolische Profile von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten aus Patient 1 bei Wachstum auf CasAA im Vergleich.....	170
3.2.6.3	Metabolische Profile von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten aus Patient 2 bei Wachstum auf CasAA im Vergleich.....	175
3.2.6.4	Metabolische Profile von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten aus Patient 1 und 2 bei Wachstum auf CasAA im Vergleich.....	179
3.2.6.5	Metabolische Profile von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten aus Patient 1 im Vergleich zu PA14 bei Wachstum auf Glucose-Methionin.....	185
3.2.6.6	Metabolische Profile von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten aus Patient 2 bei Wachstum auf Glucose-Methionin im Vergleich.....	189
3.2.6.7	Metabolische Profile von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten aus Patient 1 und 2 bei Wachstum auf Glucose-Methionin im Vergleich.....	192
4	Zusammenfassung.....	199
5	Ausblick.....	202
6	Referenzen.....	203
7	Anhang.....	217
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	217
7.2	Tabellenverzeichnis.....	223

7.3	Parameter für die qualitative Prozessierung mit AMDIS.....	228
7.4	Vergleich semiquantitativer Intensitäten von Metaboliten der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck.....	229
7.5	Vergleich semiquantitativer Intensitäten von Metaboliten der Referenzstämme bei Wachstum auf diversen Kohlenstoffquellen.....	231
7.6	PCA der TM in Bezug auf den TBCF10839 bei Wachstum auf Succinat.....	237
7.7	Vergleich semiquantitativer Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 mit TBCF10839 bei Wachstum auf diversen Kohlenstoffquellen.....	237
7.8	Varianzanalysen der hydrophoben Phase anhand des T-Tests der TM PA5349 und des TBCF10839 bei Wachstum auf Succinat	250
7.9	Vergleich semiquantitativer Intensitäten von Metaboliten von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten von CF-Patienten bei Wachstums auf CasAA.....	251
7.10	Vergleich semiquantitativer Intensitäten von Metaboliten von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten von CF-Patienten bei Wachstums auf Glucose-Methionin.....	264
8	Abkürzungen.....	272
9	Danksagung.....	274
10	Lebenslauf.....	275

1 Einleitung

1.1 Systembiologie

In den Biowissenschaften werden zunehmend komplexere Datenmengen mit Hilfe von modernen analytischen Methoden in Hochdurchsatzverfahren aus unterschiedlichen Disziplinen gewonnen, wie der Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik (Abb. 1). Bisher hat die Auswertung von Daten häufig nur innerhalb der einzelnen Disziplinen stattgefunden. Ein tiefer gehendes Verständnis von biologischen Systemen und regulatorischen Mechanismen war oft nicht möglich und hat zur Etablierung einer neuen Disziplin, der Systembiologie, geführt.

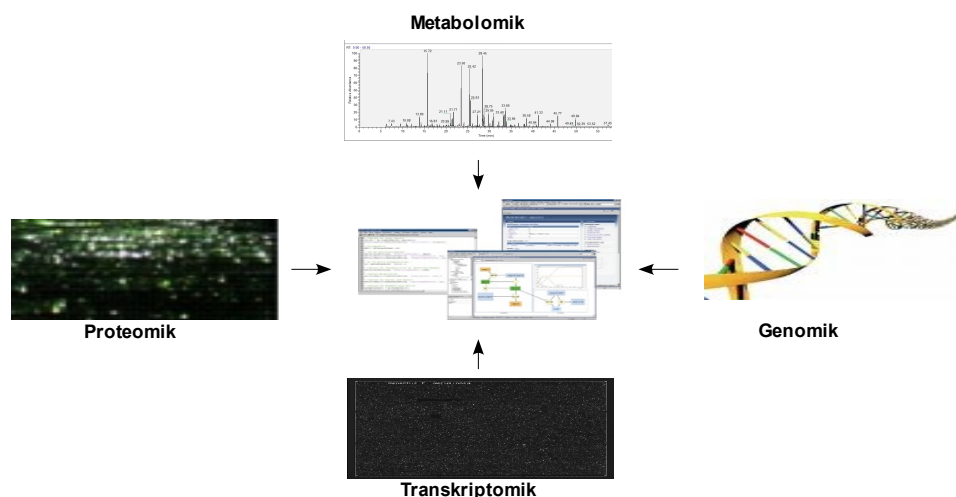


Abb. 1. Systembiologie als Einheit und ihre unterschiedlichen Disziplinen

Das Ziel der interdisziplinären Systembiologie ist die Erzeugung von Modellen heterogener zellulärer Netzwerke anhand mathematischer Modelle. Entscheidender Impetus für diese ehrgeizige Zielsetzung ist die Tatsache, dass es mit Hilfe moderner biochemischer Hochdurchsatzmethoden (DNA-, RNA- und Protein-Microarrays (ter Linde et al., 1999; Pollak et al., 1999); 2-D Gel-Elektrophorese von Proteingemischen mit anschließender MALDI-TOF-MS (Shevchenko et al., 1996; Lilley et al., 2002); Metabolitanalytik mittels HPLC-MS und GC-MS (Tolstikov & Fiehn, 2002; Waterman et al., 2004; Shepherd et al., 2004; Strelkov et al., 2004)) möglich geworden ist, eine fast vollständige Abbildung des molekularen Zustandes einer Zelle anzufertigen, d.h. gleichzeitig die Konzentrationen von DNA-, mRNA-Molekülen, Proteinen und Stoffwechselprodukten zu bestimmen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt im Bereich der Metabolomanalyse, auf die im Folgenden näher eingegangen wird (vgl. Kap. 1.2).

1.2 Metabolomanalyse (Metabolomics)

Das Ziel der Metabolomforschung ist die Entwicklung einer Methode zur Analyse von Stoffwechselprodukten (Metaboliten), die unverfälscht, robust, reproduzierbar, sensitiv sowie akkurat ist. Sie beschäftigt sich mit dem Metabolom einer Zelle, das die Gesamtheit aller Metabolite und ihre zellulären Konzentrationen unter gegebenen Bedingungen beschreibt. Das Metabolom einer Zelle oder eines Organismus unterliegt einer ständigen Dynamik und ist das Endprodukt eines biochemischen Netzwerkes. Stoffwechselwege bestehen aus Serien enzymatischer Konversion, die spezifische Produkte liefern, wie z.B. Aminosäuren, Zucker oder Lipide. Metabolite sind essentielle Komponenten der Zelle; nur durch die mit Metaboliten verbundenen und durch Enzyme katalysierten Umwandlungsprozesse kann die Zelle Energie gewinnen und für den Aufbau z.B. von Proteinen oder DNA nutzen.

Metabolomanalysen wurden in einer Vielzahl von biologischen Systemen durchgeführt, wie z.B. *Corynebacterium glutamicum* (Strelkov et al., 2004; Börner et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (Choi et al., 2007; Thielen, 2007), *Escherichia coli* (Buchholz et al., 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Raamsdonk et al., 2001) oder der *Pichia anomala* (Fredlund et al., 2003). Analysen des Pflanzenmetaboloms wurden realisiert (Schauer & Fernie, 2006; *Solanum tuberosum*, Roessner et al., 2000; *Arabidopsis thaliana*, Fiehn, 2002; *Cucubita maxima*, Fiehn, 2003; *Perilla frutescens*, Yamazaki et al., 2003), wobei Genotypen, Phänotypen und sogar Ökotypen unterschieden werden konnten. Metabolitkonzentrationen in einer biologischen Matrix weisen unterschiedlich starke Abundanzen auf, können über neun Größenordnungen (pM-mM) variieren, und ihre metabolische Reaktionshalbwertszeit beträgt gewöhnlich weniger als 1 Sekunde (Dunn et al., 2005).

Die Metabolomanalyse gliedert sich in diverse analytische Strategien auf (Abb. 2). Nicht eine allein, sondern eine Reihe dieser aufeinander aufbauenden Strategien ist notwendig, um alle Metabolite einer Spezies erfassen zu können.

Metabolomics ist der konventionelle Oberbegriff. Allerdings werden alle Bezeichnungen als Synonym verwendet, obwohl sie feine Unterschiede in ihren Definitionen aufweisen, was eine eindeutige Terminologie erschwert (Dunn et al., 2005) (Abb. 2).

Metabolomics-Techniken können in zwei Analysestrategien untergliedert werden. Einerseits die gerichtete (*targeted*) und andererseits die ungerichtete (*untargeted*) Analyse. Zu der *targeted* Analyse wird das *Metabolic profiling* gezählt. Es werden dabei nur bestimmte Metabolite betrachtet, deren Spektren in Bibliotheken (Strelkov et al., 2004;

Golm-Metabolom-Datenbank; Kopka et al., 2004) hinterlegt sind und für die Identifizierung herangezogen werden können. Sie findet zum Beispiel beim Klassifizieren von metabolischen Phänotypen Verwendung.

Bei der *untargeted* Metabolomanalyse werden die Metabolitenmuster jeglicher in einer biologischen Matrix zugänglichen Metabolite detektiert. Dabei werden sowohl durch hinterlegte Spektren identifizierte Metabolite als auch unbekannte Komponenten qualitativ und quantitativ erfasst.

Mit dem *Metabolic fingerprint* geht eine schnelle und globale Hochdurchsatz-Analyse einher, die komplexe Proben differentieller biologischer Zustände und Ursprünge klassifiziert. *Metabolic footprinting* bezieht sich auf die Analyse des leicht zugänglichen und akkurat messbaren Exometaboloms im Hochdurchsatzverfahren.

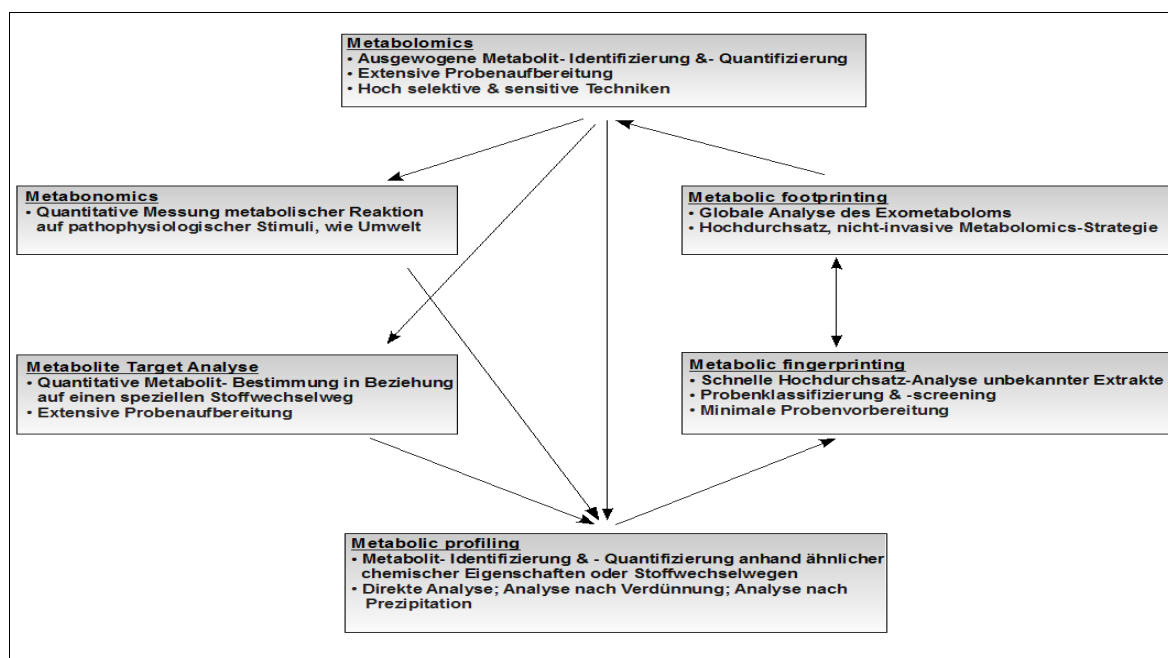


Abb. 2. Überlappende Terminologien experimenteller Strategien zur Metabolomanalyse

1.2.1 Fließschema einer Standard-Metabolom-Analyse

Chemische Heterogenität und Komplexität biologischer Proben (z.B. Struktur-Isomere, Variationen in den Konzentrationen der Analyten) stellen eine bei jeder Analyse zu bewältigende Aufgabe dar. Metabolomforschung bezieht die Analyse eines weiten Spektrums chemischen Materials, von gering molekularer Masse mit sehr polaren bis zu hochmolekularer Masse und unpolaren Fetten mit ein (Lahner et al., 2003). Das erfordert die Etablierung einer Extraktionsmethode, die an das jeweilige biologische System angepasst ist. Abbildung 3 stellt einen Abriss eines nachfolgend näher beschriebenen Fließschemas dar.

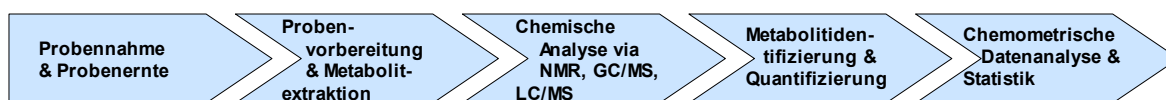


Abb. 3. Fließschema einer Standard-Metabolom-Analyse-Prozedur

1.2.1.1 Probennahme und Metabolitextraktion

Der erste Schritt für die Metabolomanalyse ist die Probennahme, d.h. die Probenernte sowie die anschließende Aufarbeitung (Probenvorbereitung), die darin besteht, die Aktivität von Enzymen zu minimieren, um das Metabolom zur Zeit der Probenentnahme zu konservieren und Veränderungen der Metabolitlevel zu verhindern (Fiehn, 2002).

Differenten Strategien der Metabolitgenerierung können angewendet werden. Extrazelluläre Metabolite aus Menschen oder biologischen Flüssigkeiten von Tieren werden entweder nicht-invasiv (Urin, Schweiß) oder invasiv (Serum, Plasma, zerebrospinale Flüssigkeit) entnommen (Grouzmann et al., 2003). Analysen des mikrobiellen Exometaboloms sind *high-throughput* und nicht-invasiv (Kaderbhai et al., 2003), da Metabolite des Exometaboloms biologischen Reaktionen, durch starke Konzentrationsverdünnung des Mediums und Fehlen der Enzyme, weniger zugänglich sind.

Eine alternative Strategie um mikrobielles Endo- und Exometabolom zu generieren, ist das *Quenching* (Castrillo et al., 2003). Das *Quenching* führt zur nahezu vollständigen Konservierung des Metabolitpools. Hierbei sind mehrere Vorgehensweisen dokumentiert, wie die Behandlung der Proben mit eiskalten Säuren (Salpetersäure, Perchlorid) (Larsson & Törnkvist, 1996; Weuster-Botz et al., 1997) oder Laugen. Allerdings treten bei anschließender chromatographischer Messung Probleme auf (Fiehn, 2002). Weitere *Quenching*-Methoden sind Einfrieren mittels flüssigem Stickstoff (Buziol et al., 2002; Mashego et al., 2003) oder Herabsetzen der Temperatur mittels alkoholischer Flüssigkeiten (Methanol, Ethanol) (Moritz et al., 2000; Wittmann et al., 2004; Loret et al., 2007; Spura et al., 2009). Jedoch können sich bei diesen Methoden die Konzentrationen einiger Metabolite, infolge eines *Cold-shock*-Phänomens, Verlust der Metabolite (Aminosäuren) durch poröse Zellwände, verändern (Wittmann et al., 2004). Zudem kann Gefriertrocknen biologischer Matrix zu irreversibler Bindung der Metabolite an die Zellwände führen, und Säurebehandlungen sind nicht für Metabolite geeignet, die bei geringem pH-Wert instabil sind.

Intrazelluläre Metabolitextraktion für z.B. *Metabolic profiling* (Kap. 1.2) wird durch die Zerstörung der Zellwände (Lyse) mittels Zermahlen (Mörser), Sonifizierung (Ultraschall) oder Mikrowellen-Technik und anschließender Distribution der Metabolite in polare Lösungsmittel (Methanol, Wasser) und unpolare Lösungsmittel (Chloroform, Hexan, Essigester), zur

Entfernung zellulärer Rückstände (Roessner et al., 2000; Fiehn et al., 2002; Strelkov et al., 2004) erzielt und findet speziell bei Bakterien und Pflanzen Anwendung. Dabei stellt die Extraktion phosphorylierter Komponenten aufgrund der Spaltung der Phosphatgruppen in wässrigem Milieu, der Interaktionen mit Phospholipiden in der Zelle und der Hydrolyse von Triphosphaten ein großes Problem dar (Garcia et al., 2008).

Trotz dieser Problematik ist die Strategie der intrazellulären Metabolitextraktion Grundlage der vorliegenden Arbeit, da sie stabile und reproduzierbare Ergebnisse erzielt, beginnend mit der Isolierung des Endometaboloms mittels Zentrifugation bei 4°C und anschließendem Waschen der Zellen mit 4°C kalter 0,9% NaCl- Lösung, gefolgt von einer Zellyse durch Sonifizierung im Ultraschallbad mit Methanol bei 70°C (Strelkov et al., 2004).

1.2.1.2 Chemische Analyse via NMR, GC-MS und LC-MS

Für die Messung relativer, absoluter Metabolitkonzentrationen werden diverse analytische Methoden aufgeführt. Allerdings erlaubt keine dieser momentan zur Verfügung stehenden Methoden die simultane Detektion aller auftretenden Metabolite in einer Probe (Dunn et al., 2005). Dies hängt in erster Linie von der Polymorphie der auftretenden Metabolite, d.h. deren Masse, Polarität, Volatilität sowie der jeweiligen gerätetechnischen Eigenschaften ab. Im Folgenden werden einige Messtechniken mit ihren Vor- und Nachteilen vorgestellt. Die Metabolom-Analyse kann durch NMR (Raamsdonk et al., 2001; Gavaghan et al., 2000), GC-MS (Roessner et al., 2000; Dauner & Sauer, 2000; Strelkov et al., 2004; Börner et al., 2007) und LC-MS (Buchholz et al., 2002) erfolgen.

Zu den Vorteilen der NMR-Spektroskopie zählen der geringe Aufwand in der Probenvorbereitung, der Einsatz geringen Probenvolumens (Griffin et al., 2002), eine schnelle Analysezeit, die hohe Reproduzierbarkeit, die robuste Technik, die hohe Auflösung, die zur 3D-Strukturauflösung von Biomolekülen (Eiweißstoffe/Stoffwechselprodukte) führt. Allerdings hat die NMR auch Nachteile, wie die Detektion von lediglich hochabundanten Analyten, limitierte Referenzbibliotheken, der Kostenaufwand einzelner Messungen und der Verlust der Sensitivität. Um dem Verlust der Sensitivität entgegenzuwirken, werden Techniken kombiniert, wie bei der LC-NMR (Jones & Cheung, 2007).

Die GC-MS ist ein kombiniertes analytisches System aus Gaschromatograph und Massenspektrometer. In der Regel findet die Elektronenstoß-Ionisation (EI-Ionisation) Anwendung. Die Vorteile sind die erhöhte Sensitivität, die Identifikation der Komponenten mittels Datenbankeinträgen, Referenzbibliotheken sowie frei verfügbare Auswertesoftware (AMDIS (Stein, 1999; Stein & Mallard, 2007), MetaboliteDetector (Hiller et al., 2009)), die

hohe Nachweisstärke, ein schnelles Analyseverfahren, stabile und reproduzierbare Technik. Techniken, wie 2D-Chromatographie (Shellie et al., 2005), Time of Flight (TOF)- und Ionenfallenmassenspektrometer weisen eine gesteigerte Sensitivität, verglichen mit der Quadrupol-basierenden Technik, auf (Griffin, 2006). Allerdings zeigt auch die GC-MS basierte Metabolomanalyse Nachteile auf. GC-MS ist lediglich für flüchtige, thermostabile Komponenten geeignet, oder es bedarf einer Vorbereitung (Derivatisierung (Kapitel 1.2.3)) bestimmter Verbindungen, um diese der Analyse zugänglich zu machen. Dennoch wird die GC-MS als *'goldener Standard'* in der Disziplin der *Metabolomics* anerkannt (Jones & Cheung, 2007).

Die LC-MS Methode ist eine zur GC-MS komplementären Technik, bei der größere Komponenten (z.B. Sekundärmetabolite) analysiert werden können. Vorteilhaft ist die Durchführung der Analyse bei moderaten Temperaturen sowie ohne vorherige Derivatisierung der Metabolite (Dunn & Ellis, 2005). Dadurch erweitert sich das Spektrum der zu messenden Analyten, das sie zu einer universellen Technik macht, die gleichermaßen ihre Nachteile aufweist, wie die nicht stabilen Retentionszeiten sowie die große Vielfalt an Methoden, die die Verfügbarkeit von Referenzbibliotheken einschränkt. Eine zusätzliche Problematik stellt der Matrix-Effekt sowie die geringe Reproduzierbarkeit der Proben dar.

1.2.1.3 Metabolit-Identifizierung und -Quantifizierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle aufgeführten Metabolomanalysen mittels GC-Quadrupol-MS durchgeführt, um Metabolite des Primärmetabolismus zu erfassen. Die Kopplung erlaubt eine Identifizierung über die charakteristische Retentionszeit und Massenspur jedes einzelnen Metaboliten. Die anschließende Identifizierung und Quantifizierung kann anhand von zwei in der Arbeitsgruppe etablierten Standardprotokollen durchgeführt werden: einerseits mit AMDIS/Xcalibur in Kombination mit den von Strelkov (2004) & Thielen (2007) entwickelten Bibliotheken oder andererseits mit dem kürzlich von Hiller et al. (2009) etablierten frei verfügbaren Programm MetaboliteDetector (MD).

1.2.1.4 Chemometrische Datenanalyse und Statistik

Die chemometrische Datenanalyse und Statistik dient der Integration der erhaltenen hochdimensionalen, multivarianten Datenmatrix in metabolische Netzwerke. Diese können in Form einer stoichiometrischen Matrix (Schilling & Palsson, 1998) oder mittels graphenbasierter Ansätze (Jeong et al., 2000) modelliert werden. Da das Ziel der Metabolomanalyse die Messung des gesamten Metaboloms einer biologischen Matrix ist, können für

erste Informationen über die Abschätzung der Gesamtzahl der Metabolite, Daten aus Genomannotationen herangezogen werden (Kopka et al., 2004; Kell, 2004), die in der KEGG-Datenbank (Ogata et al., 1999) frei zugänglich hinterlegt sind. Eine erste multivariante statistische Technik ist die Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis* – PCA), die die Basis der multivarianten Datenanalyse bildet. PCA transformiert die Variablen des Datensatzes in eine geringere Anzahl latenter Variablen, in die Hauptkomponenten (*principal component* - PCs). Die erste PC behauptet dabei den größten Anteil der Informationen der Datenmatrix. Ergänzende chemometrische Techniken sind hierarchische Clusteranalysen (HCA) sowie Varianzanalysen (ANOVA). HCA ist, ebenso wie die PCA, ein Datenreduktionsverfahren. Sie dient der Mustererkennung und stellt Zusammenhänge übersichtlich dar. ANOVA wertet das Datenmaterial unspezifisch anhand von Mittelwertvergleichen mit mehr als 2 differenten Gruppen aus und kann als Erweiterung des T-Tests angesehen werden. Für statistische Datenanalyse wurde die CUMETA (Schrader & Schomburg, 2005, unveröffentlicht), eSOMet (Haddad et al., 2009) und TIGR MeV (Eisen et al., 1998; Raychaudhuri et al., 2000) Software verwendet. Für die Visualisierung von Konzentrationsvergleichen, projiziert auf Stoffwechselwegen, wird die frei zugängliche Software VANTED (Junker et al., 2006) angewendet. Ergänzende Informationen über Enzyme und Stoffwechselwege können aus BRENDA (Schomburg et al., 2002), Pathway Hunter Tool (Rahman et al., 2005), BioCyc & MetaCyc (Karp et al., 2000, 2005; Caspi et al., 2008), PseudoCyc (Winsor et al., 2005) und SYSTOMONAS (Choi et al., 2007) extrahiert werden, um metabolische Netzwerke zu komplementieren.

1.2.2 Gaschromatographie – Massenspektrometrie

Die GC-MS gestützte Metabolomanalyse flüchtiger, thermostabiler polarer und unpolarer Metabolite ist in den letzten Jahren signifikant angewachsen. Die gekoppelte GC-Q-MS-Analyse führt im Gaschromatographen zu einer Trennung der Metabolite, die durch den Retentionsindex und das Massenspektrum identifiziert werden können. In einem Massenspektrometer erfolgt die Bestimmung der Molekülmassen aufgrund des Masse/Ladungszahlverhältnisses (m/z).

Die wesentlichsten Funktionseinheiten der GC-MS sind der Autosampler, der Injektor, der Gaschromatograph mit der Säule und das Massenspektrometer mit dem Detektor.

Die Injektion geringer Probenvolumina (1-2 μ l) erfolgt über einen Injektor auf eine hochauflösende Kapillarsäule. Die Säulen weisen eine Länge von 30-60m auf und tragen eine mit 5-50% Diphenylgruppen ausgekleidete stationäre Phase. Die mobile Phase besteht

aus einem inerten Gas mit guten Strömungseigenschaften, wie Helium. Diese Charakteristika der Säule erlauben sensitive Analysen mit einem Detektionslimit von μM - nM - Konzentrationen. *Splitless*-Injektionen finden Anwendung bei Spurenanalysen, da diese die höchste Sensitivität erfordern (Robards et al., 1997). Ebenso sind *Split*-Injektionen konventionell (Strelkov et al., 2004).

Metabolite können in zwei Klassen gegliedert werden: einerseits flüchtige Metabolite, die keine, und andererseits nicht flüchtige Metabolite, die eine chemische Derivatisierung erfordern. Die Eluierung flüchtiger Proben wird über die Gaschromatographie direkt ermöglicht. Konträr dazu werden die nicht flüchtigen Metabolite (Aminosäuren, organische Säuren, Zucker, phosphorylierte Verbindungen, Amine, Lipide) einer zeitaufwendigen, zweistufigen chemischen Derivatisierungsprozedur unterzogen, beginnend mit der Umsetzung der Keto- und Aldehydgruppen mit Methoxyamin zur Reduktion von Zuckerisomeren (Methoxymierung) (Blau & King, 1977) und anschließender Umsetzung der Carboxyl-, Amid-, Alkohol- und Amingruppen, hervorgerufen durch MSTFA (Silylierung). Die Silylierung dient der Erhöhung der Volatilität von polaren Verbindungen und der thermischen Stabilität der entstandenen Gase oder verdampfbaren Flüssigkeiten. Derivatisierung bringt eine gewisse Anzahl von Derivaten hervor, die mehr als ein aktives Proton aufweisen. Derivatisierung ist effizient, quantitativ und reproduzierbar, sollte allerdings unter geringem Zeitaufwand erfolgen, da die Silylierung in Anwesenheit von Wasser reversibel ist.

Im Massenspektrometer erfolgt eine harte Ionisierung dieser durch Elektronenstoß-Ionisation (EI-Ionisation). Die gasförmigen Probenmoleküle werden mit einem Elektronenstrahl aus einem Filament von 70-eV Energie beschossen. Bei der Kollision der energiereichen Elektronen entstehen aus den Analytmolekülen positiv geladene Molekülradikationen, die weiter fragmentieren. Dadurch resultiert ein für jede Substanz charakteristisches Fragmentierungsmuster. Diese geräteunabhängigen „Fingerprints“ werden in Spektrenbibliotheken gesammelt und können der Identifizierung unbekannter Substanzen dienen. Die Ionisierungsart weist eine hohe Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und eine Fülle vorliegender Spektren von Referenzsubstanzen und -Bibliotheken auf (NIST, Strelkov et al., 2004, GMD). Eine andere weiche Ionisierungsart wäre die chemische Ionisierung (CI). Sie dient der Bestimmung der molaren Masse (und erzeugt die Molekülionen).

Im Anschluss an die Ionisation erfolgt die Massenanalyse. Diese erfolgt auf unterschiedliche Art und Weise, wie z.B. in *time-of-flight*- (TOF), *Ion Trap*- oder *Quadrupol*-Systemen. In den *time-of-flight*-Systemen wird die Massentrennung nach Flugzeit in Verbindung mit einer gepulsten Ionenerzeugung, und in den *Ion Trap*-Systemen durch Einfangen von Ionen in einer elektrischen Ionenfalle, durchgeführt. Ein *Quadrupol*-System,

wie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, besteht aus vier parallelen Metallstäben. Für die Massenanalyse wird eine Gleichspannungsrampe und gleichzeitig eine Wechselspannung an die Stäbe angelegt. Gegenüberliegende Stäbe weisen die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung und nebeneinanderliegende die entgegengesetzte Polarität und um eine um 180 Grad versetzte Phase auf. Zum Scannen werden Gleichspannungshöhe und Wechselspannungsamplitude gleichzeitig erhöht, deren Verhältnis konstant bleibt. Die durchfliegenden Ionen beschreiben Oszillationen. In dieser Phase liegen nur für Ionen mit bestimmtem m/z -Wert stabile oszillierende Flugbahnen vor. Ionen mit einem anderen m/z -Verhältnis werden anhand ihrer zunehmenden Flugbahn eliminiert.

Anhand der von Strelkov et al. (2004) entwickelten Pipeline konnten mit gekoppelter GC-Q-MS rund 1000 Peaks detektiert werden, wovon 330 biologischen Ursprungs sein könnten. Davon wurden mittels Referenzsubstanzen 121 Metabolite in Bakterien identifiziert. Tolstikov & Fiehn (2002) detektierten in Pflanzenextrakten 1700 Peaks, davon konnten 150 Metabolite identifiziert und quantifiziert werden.

1.3 Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum*

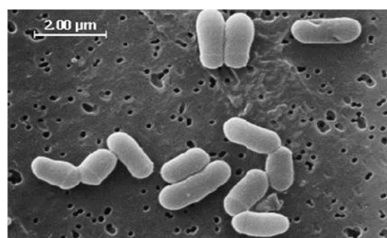


Abb. 4. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum* (Libl, 2005)

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives, nicht-pathogenes, Aminosäuren-produzierendes, schnellwachsendes Bodenbakterium mit großer biotechnologischer Bedeutung. Die Zellen weisen eine Breite von 0,7 µm bis 1,0 µm und eine Länge von 1,0 µm bis 3,0 µm auf. Es wächst aerob, ist nicht sporulierend, und die Morphologie ist namensgebend für die gesamte Gattung *Corynebacterium* (*coryne*, griechisch für Keule). Die optimale Kultivierungstemperatur liegt zwischen 25 und 37°C (Abe et al., 1967). Taxonomisch gehört *C. glutamicum* zur Familie der Aktinomyceten (Stackebrandt et al., 1997; Liebl, 2005) und ist mit Pathogenen wie *C. diphtheriae*, *Mycobacterium leprae* und *M. tuberculosis* verwandt.

Charakteristische Merkmale der *Corynebacteriaceae* sind ein hoher Guanin- und Cytosin-Gehalt (G+C) (etwa 54%) und der spezielle Aufbau der Zellwand mit einer Mycolsäureschicht. Diese stellt ähnlich, wie die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien, eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere dar (Minnikin et al., 1978; Bayan et al., 2003; Daffe, 2005).

C. glutamicum wurde in den 50er Jahren in Japan (Abe et al., 1967; Kinoshita, 2005) als natürlicher Glutaminsäureproduzent entdeckt, denn es kann unter optimalen Kultivierungsbedingungen aus Glucose große Mengen Glutaminsäure fermentativ herstellen. Zudem sind genetisch modifizierte Stämme auch in der Lage, Lysin zu produzieren (Eggeling et al., 1998, Eggeling & Sahm, 2001). Das macht sich vor allem die Lebensmitteltechnologie - Glutaminsäure - und die Futtermittelindustrie - Lysin - zu Nutzen. Die Weltproduktion beträgt dabei ungefähr $1 \cdot 10^6$ Tonnen Glutamat und $3 \cdot 10^5$ Tonnen Lysin pro Jahr (Nolden et al., 2000). Mittlerweile wurden für nahezu alle biogenen Aminosäuren und eine Reihe weiterer Substanzen wie Nukleotide (Leuchtenberger, 1996) und Vitamine (Chassagnole et al., 2003) fermentative Produktionsprozesse unter Verwendung von *C. glutamicum* und anderen nahen verwandten Organismen entwickelt (Eggeling & Bott, 2005).

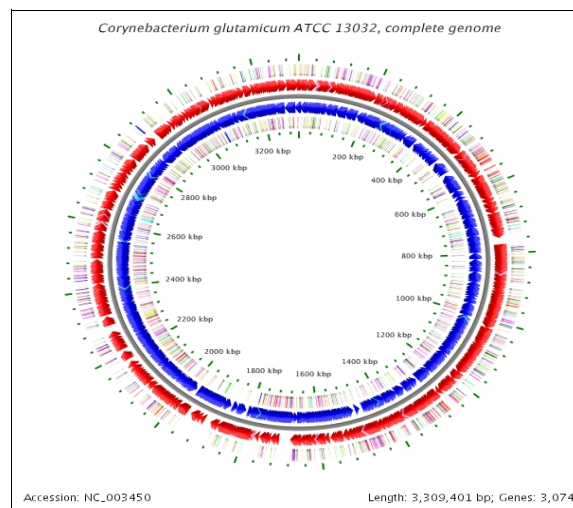


Abb. 5. Chromosom von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
(http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/graphs_cgview.html)

Die Sequenzierung der DNA von *C. glutamicum* begannen Mitte der 1980er, als Gene der Aminosäure-Biosynthese in *C. glutamicum* kloniert und analysiert wurden. Die Gene wurden durch heterologe Komplementierung von *E. coli* Mutanten identifiziert (Eggeling & Bott, 2005). Die ersten Schritte in Richtung vollständiger Genomsequenz von

C. glutamicum wurden durch die Bestimmung der Genomgröße und der physikalischen und genetischen Kartierung vorangetrieben (Bathe et al., 1996). Die mit Pulsfeld-Gelelektrophorese bestimmte Genomgröße ergab 3.1 Megabasenpaare (Mbp) und besteht aus einem einzigen zirkulären Chromosom. Allerdings wurde einige Jahre später, durch zwei unabhängige Forschungsgruppen, die Genomgröße auf etwa 3.28 Mbp (Kalinowski et al., 2003) und 3.3 Mbp (Ikeda & Nakagawa, 2003) (Abb.5) nach oben korrigiert. Die Variation der Genomgröße von annähernd 27 Kilobasenpaaren kommt infolge zusätzlicher Kopien von Insertionselementen und einem zusätzlichen putativen Prophagen, der im größeren Genom inseriert vorliegt, zustande (Eggeling & Bott, 2005). Es weist ungefähr 3000 proteinkodierende Gene sowie einen hohen G+C-Gehalt von 53.8% auf (Kalinowski et al., 2003; Ikeda & Nakagawa, 2003).

Aufgrund der guten Charakterisierung und der großen Anzahl an etablierten Methoden gilt *C. glutamicum* als Modellorganismus für G+C-reiche Gram-positive Mikroorganismen (Burkovski, 2003; Gibson et al., 2003). Mori & Shio (1987) detektierten mittels genetischer und biochemischer Analysen drei Phosphotransferasesysteme (PTS) zur Aufnahme von Glucose, Fructose und Sucrose. Des Weiteren kann es nicht nur auf diversen Zuckern, sondern auch auf organischen Säuren und Alkoholen wachsen (Liebl, 1991; Wendisch et al., 2000; Gerstmeir et al., 2003; Eggeling & Bott, 2005; Frimmersdorf, 2005). Durch diese Fähigkeit differentielle Nährstoffe zu konvertieren, kann es flexibel auf metabolischer Ebene reagieren. Dieser enormen Anpassungsfähigkeit liegt eine ausgesprochene metabolische Robustheit zugrunde, die besondere Interessen für metabolische Analysen weckt. Gerstmeir et al. wies 2003 einen aktiven Glyoxylat-Weg bei Kultivierung auf Acetat nach. Des Weiteren wurden metabolische Flussanalysen eines Lysinproduzierenden *C. glutamicum* Stammes bei Wachstum auf Glucose bzw. Fructose analysiert (Kiefer et al., 2004). Anhand von GC-Q-MS konnte Strelkov et al. (2004) 121 Metabolite mittels Referenzsubstanzen identifizieren.

Mittels vollständig entschlüsselter Genomsequenz wurden Analysen des Transkriptom mit DNA-Microarrays und des Proteoms mit 2-D-Gelelektrophorese vorangetrieben und ermöglichen Rückschlüsse auf regulatorische Netzwerke in *C. glutamicum* zur Kontrolle des Zentralstoffwechsels (Gerstmeir et al., 2003; Cramer, 2006), des Stickstoffhaushalts (Silberbach et al., 2005; Silberbach & Burkovski, 2006) und des Phosphat-Metabolismus (Ishige et al., 2003; Kocan et al., 2006).

1.4 Modellorganismus *Pseudomonas aeruginosa*

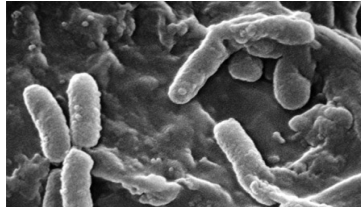


Abb. 6. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pseudomonas aeruginosa* (Nguyen, 2008)

Pseudomonas aeruginosa (aerugo, lat. = Grünspan) ist ein Gram-negatives, polar begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium, das der Familie der *Pseudomonadaceae* (Baron, 1996) und der Gruppe der γ -Proteobakterien angehört. Es weist eine Länge von 1.5 - 3 μm und einen Durchmesser von 0.5 - 0.8 μm auf. Durch die polare Begeißelung ist *P. aeruginosa* fähig, sich schnell fortzubewegen. *P. aeruginosa* kann je nach Anforderung des Habitats in einer mukoiden und in einer nicht-mukoiden Form vorkommen (Woods et al., 1991; Govan & Deretic, 1996). Liegt die nicht-mukoide Form im Biofilm vor, ist das Bakterium begeißelt, um neue Habitate erschließen zu können. In der mukoiden Form ist es von einer hochviskosen Alginatschicht umgeben (Dunne, 2002). Alginat ist ein linear anionisches Polymer aus 1,4-verknüpfter β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronsäure. Es kann sich einem weiten Spektrum unterschiedlicher Umweltbedingungen (terrestrisch, aquatisch) anpassen und zusätzlich auf pflanzlichen sowie tierischen Geweben wachsen. Das Bakterium ist ubiquitär im Erdreich und Wasser sowie auf Flächen, die in Kontakt mit diesen stehen. *P. aeruginosa* ist tolerant gegenüber einem breiten Spektrum an physikalische Stressbedingungen (z.B pH-Wert, Temperatur, Salzen), schwachen Antiseptika und vielen konventionellen Antibiotika (ausgenommen Fluoroquinolon, Gentamycin und Imipenem). Das Bakterium ist metabolisch vielseitig und kann zahlreiche Verbindungen, so auch diverse Kohlenwasserstoffe oder halogenierte Aromaten (Hickey & Focht, 1990) als Kohlenstoffquelle nutzen (Palleroni, 1985). Es wurde sowohl in fast reinem Wasser (Favero et al., 1971) als auch in einigen Desinfektionsmitteln (Adair et al., 1969) detektiert. Additiv wächst *P. aeruginosa* in einem Temperaturbereich von 4°C bis über 43°C (Hardalo & Edberg, 1997; Ramos, 2004), allerdings liegt sein Temperaturoptimum bei 37°C und die Generationszeit bei ca. 20 min. *P. aeruginosa*-Stämme produzieren diverse lösliche Pigmente: das fluoreszierende Pigment Pyoverdin (Fluorescein, gelbgrün), Pyorubin (rötlich), Pyomelanin (braun) (Braveny & Krump-Schmidt, 1985) sowie das blaue Pigment Pyocyanin (blaugrün) (Palleroni, 1986).

Die hohe Anpassungsfähigkeit an wechselnde Umweltbedingungen sowie die Vielseitigkeit in der Substratverwertung spiegeln sich in der Größe und Zusammensetzung des

Genoms wieder. Die Gattung *Pseudomonas* wurde von Migula 1894 zum ersten Mal beschrieben. In den 1950er Jahren wurden die ersten genetischen Analysen mittels klassischer Konjugationsmethode an *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt. Dadurch wurde er zum Referenzstamm (Holloway, 1955). PAO1 besitzt mit etwa 6.3 Mbp (Abb. 7) das größte Genom der bisher sequenzierten Bakteriengenome (*Escherichia coli* 4.6 Mbp; *C. glutamicum* 3.3 Mbp) (Abb. 7) und besitzt 5.570 vorhergesagte Open Reading Frames (ORF) sowie den mit ca. 9% höchsten Anteil an regulatorisch wirkenden Genen unter den bisher bekannten, vollständig sequenzierten Bakteriengenomen. Das PAO1 Genom besitzt einen Gesamt-G+C-Gehalt von 66.6%, einen Gesamtgehalt von kodierenden Regionen von 89.4% und stabile RNA von 0.4% (Stover et al., 2000).

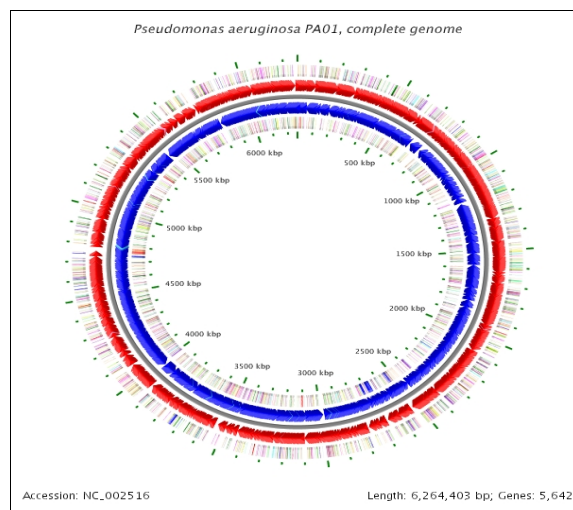


Abb. 7. Chromosom von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
(http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/graphs_cgview.html)

1.4.1 *P. aeruginosa* als opportunistisches Pathogen

P. aeruginosa ist ein opportunistisches Pathogen immunsupprimierter Individuen (van Delden & Iglewski, 1998) und kann Krankheiten wie Sepsis, Harnwegsinfektionen, chronische Pneumonie, Endokarditis, Dermatitis, Osteochondrose und Brandwundeninfektionen auslösen. Die Pathogenität geht mit einem vielfältigen Arsenal an Virulenzdeterminanten des Bakteriums einher. Zu diesen gehören unter anderem zwei toxische Proteine, Exotoxin A und Exoenzym S. Verschiedene Proteasen (Elastase, alkalische Protease) zerstören lokal die Gewebestruktur des Wirts und hydrolysieren Immunglobuline, Komponenten des Komplementsystems und Rezeptoren der Immunzellen. *P. aeruginosa* ist eines der fünf vorherrschenden Bakterien in Krankenhäusern, vor allem der Intensivmedizin (Tümmler & Kiewitz, 1999). Zu ihnen zählen *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* sowie *M. tuberculosis*. *Pseudomonas* Infektionen

in Cystischer Fibrose zeigen, wie Bakterien in atypische Habitate eindringen, adaptieren und überleben können, zudem in der Lage sind, dem Immunsystem und der Chemotherapie von immunsupremierten Patienten auszuweichen.

1.4.1.1 Cystische Fibrose (Mukoviszidose)

Cystische Fibrose (CF; Mukoviszidose = mucus „Schleim“ und *viscidus* „zäh, klebrig“) ist eine genetisch bedingte, autosomal-rezessive angeborene Stoffwechselerkrankung. Sie ist die zweithäufigste Erbkrankheit in der weißen Bevölkerung nach Hämochromatose (Reinhard et al., 2001). Bei Patienten mit dieser Erkrankung liegt eine Dysfunktion von Chloridkanälen zugrunde. Die Ursache ist ein Defekt am langen Arm des Chromosoms 7 (Tsui et al., 1985; Wainwright et al., 1985). Das betroffene Gen codiert für CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), ein Protein, das in der Zellmembran die Aufgabe eines cAMP-regulierten Chloridkanals übernimmt. Die weltweit häufigste CF-Mutation ist die $\Delta F508$, die den Verlust der 508. Aminosäure, ein Phenylalanin (F) zur Folge hat (Reinhard et al., 2001).

In Abbildung 8 wird das Modell der Pathogenität von *P. aeruginosa* anhand der CF-Lunge von Worlitzsch et al. (2002) näher betrachtet. Abbildung 8a stellt eine gesunde Lunge und Abbildungen 8b-f eine CF-Lunge dar. In einer gesunden Lunge wird die oben aufliegende Mukusschicht (hellgrün) durch Bewegungen der Zilien der Epithelzellen gereinigt (waage-rechter Pfeil). Innerhalb des dünnen Lungenoberflächenfilms liegt kein Sauerstoff-Gradient vor. Der Ausfall des CFTR führt zur Absorption von Na^+ , Cl^- und Wasser aus dem Mukus durch die Epithelzellen (Abb. 8b-c). Daraus resultiert die Erhöhung der Viskosität des Mukus, die Blockade der Zilien, die Störung des Mukustransportes und der Anstieg der Na/K-ATPase Aktivität. Der zunehmende Sauerstoffverbrauch der Epithelzellen erzeugt einen steilen hypoxischen Gradienten im verdickten Mukus (blauer Balken: anaerob; roter Balken: aerob). Dieser verfügt über adäquate Voraussetzungen für die Besiedelung mit den bereits erwähnten Bakterien (Abb. 8d). Die Besiedelung erfolgt aktiv (flagelläre Motilität) und/oder passiv (Turbulenzen der Mukusoberfläche), indem sie die hypoxiden Zonen des Mukus durchdringen.

In dieses sauerstofflimitierte Habitat adaptiert sich *P. aeruginosa* unter steigender Alginat-Akkumulation (Biofilm) und bildet „Mikrokolonien“ aus (Abb. 8e). Sie widersetzen sich der Immunabwehr einschließlich der Neutrophilen (rote V-förmige Zellen) (Abb. 8f) und mancher Antibiotika. Der die Bakterien umgebende Biofilm fördert durch die mukoide Alginat-schicht Antibiotika-Resistenzen (Nickel et al., 1985; Walters et al., 2003; Borriello et al., 2004). Während der Adaptation konvertiert der Energie-Metabolismus von aerob zu an-

aerob und als alternativer Elektronenakzeptor dienen Nitrat/Nitrit. Beide Komponenten konnten in der CF-Lunge detektiert werden (Nitrat: 30 - 420 μM ; Nitrit etwa 100 μM) (Hassett et al., 1996; Grasemann et al., 1998; Worlitzsch et al., 2002).

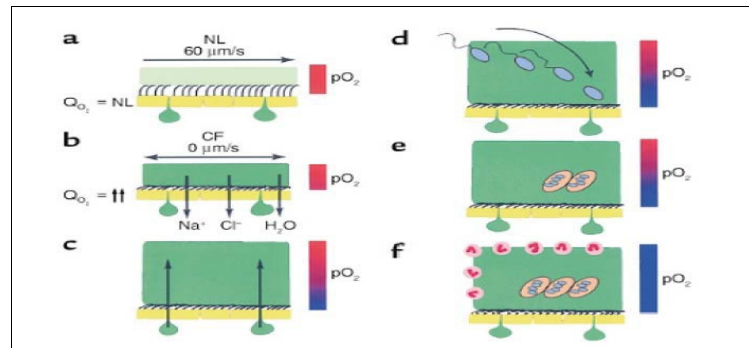


Abb. 8. Schematisches Modell der pathogenen Ereignisse, die zur chronischen *P. aeruginosa*-Infektion in den Atemwegen von CF-Patienten führen (Worlitzsch et al., 2002). a. Gesunde Lungenepithelien; b-f. CF-Lungenepithelien.

Nach Angaben des nordamerikanischen CF-Registers (Cystic Fibrosis Foundation, 1995), das 20000 CF-Patienten einbezieht, sind im Alter von 2-5 Jahren bereits 29.8% und im Alter von 26-30 Jahren 81.3% der Patienten mit *P. aeruginosa* infiziert.

1.4.1.2 Phänotypische Variationen von *P. aeruginosa* bei Cystischer Fibrose

P. aeruginosa kann in CF-Patienten ein „dissoziatives Verhalten“ (Zierdt & Schmidt, 1964) aufweisen, d.h. viele CF-Patienten sind nur mit einem *P. aeruginosa*-Genotyp chronisch infiziert (Breitenstein et al., 1997), allerdings besitzen die Isolate differente Kolonie-Morphologien. Die Mukoidität der CF-Isolate beruht auf einer Mutation im *mucA* Gen des *muc* Operons, das in der Kontrolle der Biosynthese des Exopolysaccharides Alginate mitwirkt, und stellt einen Hotspot für Mutationen in *P. aeruginosa* dar (Bragonzi et al., 2006). *P. aeruginosa* CF-Isolate sind in den meisten Fällen, aufgrund fehlender Typ IV Pili oder Flagellen, unbeweglich (Luzar & Montie, 1985; Mahentiralingam et al., 1994; Whiteley et al., 2001) (Abb. 9). Zusätzlich weisen CF-Isolate Lipopolysaccharid und Pyocin Defizite eine geringere Empfänglichkeit für Phagen (Römling et al., 1994) sowie verminderte Virulenz bei akuten respiratorischen Infektionen im Maus-Modell (Luzar & Montie, 1985) auf. Während der chronischen Persistenz erfolgt eine Abnahme der Cytotoxizität (Lee et al., 2005). „Small colony variants“ (SCV) (Häussler et al., 1999) sowie mukoide Kolonien (Govan & Deretic, 1996) werden formiert. Zu Beginn einer Infektion mit *P. aeruginosa* werden CF-Patienten mit dem nicht-mukoiden Phänotypen besiedelt (Pier, 1998), der im Laufe der Erkrankung mukoiden Charakter annimmt und so die chronische Infektion bei CF-Patienten induziert (Koch & Høiby, 1993; Lyczak et al., 2002; Worlitzsch et al., 2002).

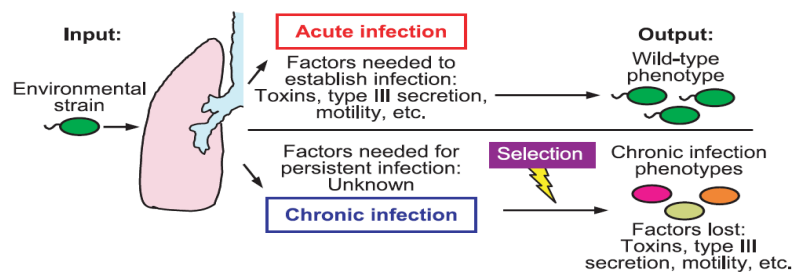


Abb. 9. Genetische Adaptation von *P. aeruginosa* während akuter & chronischer CF-Infektionen (nach Nguyen, 2006).

1.4.2 Quorum Sensing bei *P. aeruginosa*

Die meisten Gram-negativen Bakterien verfügen über ein als Quorum Sensing (QS) bezeichnetes System, das der Zell-Zell-Kommunikation dient und die Genexpression entsprechend ihrer Zelldichte reguliert (Fuqua et al., 1994). QS befähigt die Zellen, durch Autoinduktion die Zelldichte der Population zu messen und darauf zu reagieren. QS erfolgt, wenn die Konzentration eines diffusionsfähigen Signalmoleküls (Autoinducer) einen Schwellenwert erreicht (Miller & Bassler, 2001; Williams et al., 2007). Die häufigsten verwendeten Signalmoleküle Gram-negativer Bakterien sind Acyl-Homoserinlactone (AHL). Diese wurden zuerst im marinen biolumineszenten Bakterium *Vibrio fischeri* beschrieben, in dem QS die Luciferaseproduktion reguliert (Ruby, 1996), denn nur bei hoher Zelldichte wird von diesen Bakterien die Luciferase exprimiert.

In *P. aeruginosa* existieren zwei AHL-QS-Systeme, das *las* und *rhl* System (Abb. 10). Das *las*-System besteht aus dem LasR Transkriptionsregulator und dem LasI-Synthaseprotein. LasI produziert N-(3-Oxododecano-yl)-L-Homoserinlacton (3O-C₁₂-HSL) (Gambello & Iglewski, 1991; Pearson et al., 1995). LasR (Transkriptionsfaktor) wird durch 3O-C₁₂-HSL aktiviert. In der Anwesenheit von 3O-C₁₂-HSL bildet LasR Multimere. Nur diese multimere Form des Proteins kann die DNA binden und reguliert die Transkription mehrerer Gene (Kiratisin et al., 2002). LasR-AHL reguliert die Expression von LasA (Protease), LasB (Elastase), AprA (alkalischen Protease) und ToxA (Exotoxin A) (Hornef et al., 2000; Storey et al., 1998; Preston et al., 1997; Gambello & Iglewski, 1991).

Ein zweites QS-System besteht aus den RhII und RhIR Proteinen. Die RhII-Synthase produziert das N-Butyryl-L-Homoserinlacton (C₄-HSL), und RhIR ist der Transkriptionsregulator (Ochsner et al., 1994; Pearson et al., 1995). Liegt RhIR mit C₄-HSL komplexiert vor, kann es die Expression verschiedener Gene regulieren. RhIR-AHL reguliert die Produktion von Pyoverdin, Pyocyanin, Blausäure und Rhamnolipid (Brint & Ohman, 1995; van Delden & Iglewski, 1998).

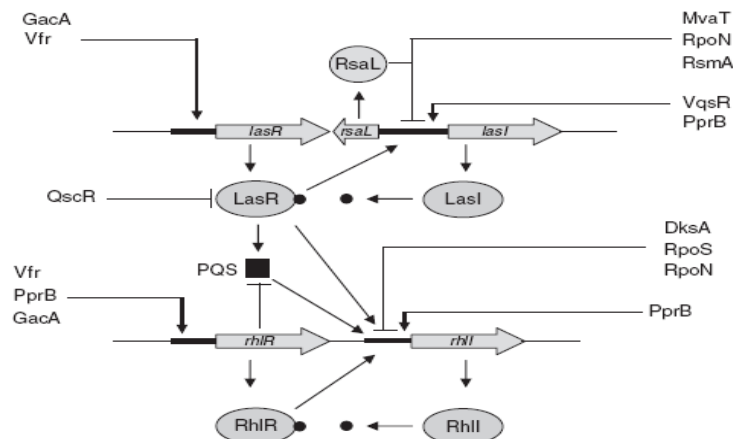


Abb. 10. Regulation des Las- und Rhl-Quorum-Sensing Systems in *P. aeruginosa* (Venturi, 2006). Pfeile an den Promoterregionen der angezeigten Gene stehen für positive Regulation, wohingegen eine Linie Repression bedeutet.

Das Las- und Rhl-System bilden eine regulatorische Kaskade (Latifi et al., 1996; Pesci et al., 1997) (Abb. 10), bei der sich Las- oberhalb der Rhl-Regulierung befindet. Das Las- und Rhl-System sind nicht kompatibel, das bedeutet, dass die RhlI-produzierten C₄-HSL Moleküle nicht LasR und dass LasI-produzierte 3O-C₁₂-HSL Moleküle nicht RhlR aktivieren können (Pearson et al., 1995). Einige QS-kontrollierten Gene werden durch beide Systeme aktiviert, wohingegen andere entweder von Las oder von Rhl induziert werden. Die *lasR*-Transkription steigert sich zu Beginn der stationären Phase. LasR/3O-C₁₂-HSL aktiviert *lasI* positiv, das einen positiven Feedback-Loop bewirkt. LasR/3O-C₁₂-HSL reguliert die *rhlR*-Expression und RhlR/C₄-HSL reguliert die *rhlI*-Transkription, was zu einer Signalverstärkung führt (Seed et al., 1995; Latifi et al., 1996).

LasR aktiviert nicht nur die Transkription von C₄-HSL, sondern auch die eines dritten QS-Systems: *Pseudomonas*-Quinolone-Signal (PQS (2-Heptyl-3-hydroxy-4-chinolon)) (Diggle et al., 2006a; Schuster & Greenberg, 2006). Es stellt einen ergänzenden Grad der Kontrolle im QS-Netzwerk dar. McKnight et al. (2000) bewies, dass *Pseudomonas*-Quinolone-Signal die *rhl*-Expression positiv reguliert, demzufolge die C₄-AHL-Akkumulation beeinflusst und kooperativ mit C₄-AHL die Zielgenexpression induziert. Die Regulation des *pqsR* wird von Las positiv und von Rhl negativ kontrolliert. *Pseudomonas*-Quinolone-Signal wird zu einem Zwischenagitor in der Signalkette und induziert PqsR, das einen positiven Feedback-Loop induziert (Wade et al., 2005).

Das AHL QS wird von einigen globalen Regulationsfaktoren beeinflusst, wie das cAMP Rezeptor regulatorische Protein Vfr, der Stationärphasen Sigma Faktor RpoS, der alternative Sigma-Faktor RpoN, das stringente Response-Protein RelA, zwei LuxR Homologe

(QscR & VqsR), die post-transkriptionalen Regulatoren RsmA und DksA, die transkriptionalen Regulationsproteine RsaL und MvaT, und das globale Zwei-Komponenten-Regulationssystem GacA-GacS. Zusätzlich kontrolliert ein zweiter 3O-C₁₂-HSL-abhängiger Transkriptionsfaktor, QscR, die Repression von *lasI*. QscR weist signifikante Homologien zu LasR und RhIR auf (Lequette et al., 2006). Diese globalen Faktoren ermöglichen eine additive Regulierung durch unter anderem die Wachstumsphase, Alarmone, Umwelteinflüsse und bis heute noch nicht genau identifizierte Impulse (Venturi, 2006).

1.5 *C. glutamicum* & *P. aeruginosa*: Energiestoffwechsel im Vergleich

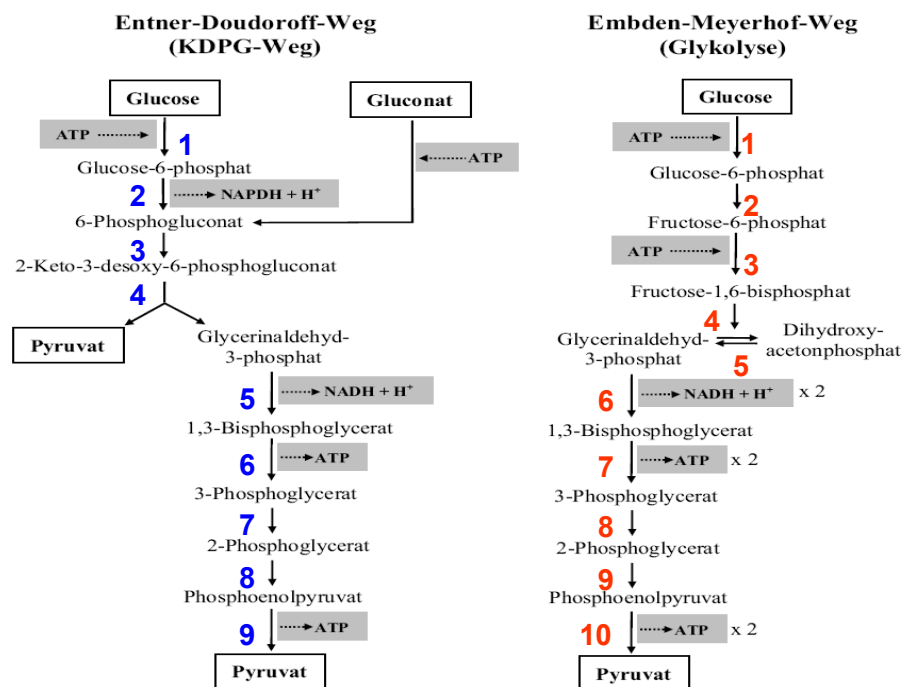


Abb. 11. Zwei Wege des Hexose-Abbaus. Aus dem Entner-Doudoroff-Weg werden aus 1 Mol Glucose 1 Mol NADH + H⁺ und 1 Mol ATP generiert, aus dem Embden-Meyerhoff-Weg aus 1 Mol Glucose 2 Mol NADH + H⁺ und 2 Mol ATP.

Vor etwa 70 Jahren wurde durch Forschungsarbeiten von Embden, Meyerhoff und Mitarbeitern der Embden-Meyerhoff-Weg rekonstruiert. Er übernimmt die Aufgabe des Glucose-Abbaus, die Bildung von Zitronensäurezyklus- und somit Aminosäuren-Intermediaten. Als Nebenprodukte entstehen ATP und Vorstufen für Biosynthesen (z.B. Pyruvat, woraus Acetyl-CoA für die Fettsäuresynthese entsteht) und ist der Energiegewinnung dienlich. Folgende Enzyme sind am Abbau der Zucker beteiligt (Abb. 11, Schritte 1-10): 1. Hexokinase, 2. Glucose-6-phosphat-Isomerase, 3. Phosphofructokinase, 4. Aldolase, 5. Triosephosphat-Isomerase, 6. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydro-

genase, 7. Phosphoglycerat-Kinase, 8. Phosphoglycerat-Mutase, 9. Enolase, 10. Pyruvat-Kinase. Regulatorisches Enzym der Glycolyse ist die Phosphofructokinase (3). Diese wird durch hohe ATP-Konzentrationen gehemmt, allerdings durch AMP aktiviert. Die Hemmung der Phosphofructokinase wird durch hohe Citrat-Konzentrationen induziert, sobald ein adäquates Level an Vorläufer-Metaboliten für Biosynthesen existent ist.

C. glutamicum nutzt diesen Weg des Zuckerabbaus zur Energiegewinnung. Dabei erfolgt die Aufnahme der Kohlenstoffquellen im Fall von Glucose, Fructose und Saccharose über drei Phosphotransferasesysteme (Yokota & Lindley, 2005; Eggeling & Bott, 2005).

C. glutamicum ist ein natürlicher Glutaminsäureproduzent und wird auch zur fermentativen Produktion von Aminosäuren und zur Herstellung von Vitaminen eingesetzt (Kap. 1.3). Es besitzt unter anderem die Fähigkeit Stickstoffquellen (z. B. Ammonium, Glutaminsäure, Glutamin, Harnstoff) aufzunehmen und zu assimilieren. Ammonium-Assimilation kann über zwei Stoffwechselwege erfolgen. Zum einen über die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und zum anderen über die Glutamin-Synthase/Glutamat-Synthase (Glutamin-Synthetase/Glutamat-Oxoglutarat-Transferase, GS/GOGAT) (Krämer et al., 1990; Krämer & Lambert, 1990; Kronmeyer et al., 1995; Eggeling & Bott, 2005).

Eine Alternative des Embden-Meyerhoff-Wegs ist der Entner-Doudoroff -Weg. Dieser - 2-Keto-3-desoxyphosphogluconat-Weg oder KDPG-Weg - wird als Katabolismus von Zuckern zum Zweck der Energiegewinnung genutzt. Entdeckt wurde der Entner-Doudoroff-Weg 1952 in *P. saccharophila* (Entner & Doudoroff, 1952; de Ley, 1960). Weiterhin wird er von diversen Organismen, wie Archaeen, Bakterien und Eukaryoten verwendet und ist daher in der Natur weit verbreitet. Im Entner-Doudoroff-Weg läuft die Umsetzung von Glucose zu Glyceraldehyd-3-phosphat (1. Hexokinase, 2. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 3. 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, 4. KDPG-Aldolase) und Pyruvat über die Spaltung von KDPG ab (Kovachevich, 1955 a, b). 6-Phosphogluconat, der direkte Vorläufer von KDPG, ist ein Schlüsselintermediat der Kohlenhydrat-Dissimilation und stellt eine Quelle für Pentosephosphat über den Hexose-Monophosphat-Weg dar. Der untere Teil des KDPG-Wegs (Abb. 10, Schritte 5-9) folgt dem EM-Weg. *Pseudomonaden* bestreiten zu 71% den KDPG und zu 29% den Pentosephosphat-Weg (Fuchs et al., 2007).

P. aeruginosa ist fakultativ anaerob und bevorzugt Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor. Allerdings besitzt es die Fähigkeit, bei Sauerstofflimitierung eine Denitrifikation durchzuführen, wobei N-Oxide als alternative Elektronenakzeptoren dienen. Denitrifikation bezeichnet die Konvertierung des im Nitrat gebunden Stickstoffs zu molekularem Stickstoff. Die bei diesen Prozessen ins Periplasma übertragenen Protonen dienen durch den Aufbau eines elektronischen Protonengradienten (*proton motive force*, *PMF*) und

Bildung einer Potentialdifferenz der Energiekonservierung (Williams et al., 1978).

Zusätzlich ist *P. aeruginosa* in der Lage, die Aminosäure Arginin zur Energiegewinnung in einem anaeroben Medium ohne alternativen Elektronenakzeptor zu nutzen (Vander Wauven et al., 1984). Arginin wird dabei quantitativ über drei Enzyme zu Ornithin abgebaut, während ein Molekül ATP generiert wird. Allerdings dient Arginin nicht als Kohlenstoffquelle, sondern lediglich der Energiegewinnung (Vander Wauven et al., 1984). Da das entstandene Ornithin ins Medium exkretiert wird, muss entweder die Kultivierung in einem Vollmedium durchgeführt oder eine alternative Kohlenstoffquelle beigelegt werden.

P. aeruginosa wurde früher als ein aerob, nicht-fermentatives Bakterium beschrieben (Palleroni, 1984). Interessanterweise ist es unter anaeroben Bedingungen, über 18 Tage hinweg, fähig, mittels der Pyruvatfermentation zu überleben (Eschbach et al., 2004). Dabei wird Pyruvat zu Lactat, Acetat und Succinat konvertiert. 1 Mol ATP wird generiert und 1 Mol $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird durch die Konvertierung von 1 Mol Pyruvat rückgewonnen.

Der Pentosephosphatweg wird sowohl von *C. glutamicum* als auch von *P. aeruginosa* benutzt. Er stellt einen Bypass der Glycolyse dar, abzweigend von Glucose-6-phosphat und die Glycolyse einspeisend über Fructose-6-phosphat bzw. Glyceraldehyd-3-phosphat. Sieben Enzyme sind daran beteiligt. Die ersten drei Enzyme, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconolactonase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, stellen einen oxidativen Weg dar, in dem Glucose-6-phosphat in Ribulose-5-Phosphat unter der Bildung von 2 Mol NADPH konvertiert wird. Die generelle Aufgabe des Pentosephosphatweg ist es, die anabolischen Reduktionsäquivalente und Vorläufermetabolite, wie NADPH, Ribose-5-phosphat und Erythrose-4-phosphat für Biosynthesen von Aminosäuren oder aromatischen Vitaminen bereitzustellen und zu regulieren.

Ebenfalls wie der Pentosephosphatweg wird auch der Krebszyklus oder Zitronensäurezyklus von beiden Bakterienarten vollständig oder teilweise durchlaufen, allerdings unabhängig von der dargebotenen Kohlenstoff- oder Energiequelle. Ein Grund dafür ist, dass der Zitronensäurezyklus den katabolischen und anabolischen Zwecken dient. Einerseits ist er verantwortlich für die vollständige Oxidation von Acetyl-CoA. Dieser Prozess generiert ATP und stellt dem membrangebundenen Respirationssystem Reduktionsäquivalente bereit. Andererseits liefert er Vorläufermetabolite, wie 2-Oxoglutarat und Oxaloacetat für die Biosynthese von zum Beispiel Aminosäuren. Während des Wachstums auf Substraten, die in den Zentralmetabolismus auf der Ebene des Acetyl-CoA eingespeist werden, wie Acetat, Fettsäuren oder Ethanol, ist der Glyoxylat-Zyklus aktiv. Dieser Bypass des Zitronensäurezyklus vermeidet die oxidative Decarboxy-

lierung der Isocitratdehydrogenase und des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes und weist schließlich eine Nettobilanz 1 Moleküls Malat aus 2 Molekülen Acetyl-CoA auf.

1.6 Fermentation

Der Begriff „Fermentation“ hat zweierlei Bedeutung und weist somit eine Diskrepanz auf. Mikrobiologisch wird mit dem Begriff „Fermentation“ die Gärung bezeichnet, in der ein anaerober Katabolismus einer organischen Verbindung vorliegt, in dem diese Verbindung als Elektronenakzeptor oder Elektronendonator fungiert. Währenddessen wird ATP über die Substratkettenphosphorylierung produziert.

In der Biotechnologie hingegen wird mit dem Begriff „Fermentation“ die Umsetzung von biologischen Materialien mit Hilfe von Bakterien-, Pilz- oder Zellkulturen oder aber auch durch Zusatz von Enzymen (Fermenten) verdeutlicht. Diese Umsetzung bei der Herstellung von z.B. Antibiotika wird in Fermentern (Bioreaktoren) durchgeführt - abhängig von den gewünschten Produkten, in statischer oder kontinuierlicher Kultur. Unterschieden werden aerobe von anaeroben Fermentationen, bei der anstelle von Sauerstoff Nitrat als Elektronenakzeptor dient. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff „Fermentation“ vorwiegend in seiner biotechnologischen Bedeutung angewendet.

Mikroorganismen sind in der Lage, Stoffe zu bilden, die sich auf rein chemischem Wege nur schwer oder gar nicht synthetisieren lassen. Fermentierung in der Nahrungsmitteltechnologie bezeichnet die Aufbereitung und Veredelung von vorwiegend pflanzlichen Lebens- und Genussmitteln. Durch die Tätigkeit diverser Bakterien, Pilze sowie pflanzen-eigener Enzyme entstehen charakteristische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe.

1.6.1 Fermenter

Ein Fermenter oder Bioreaktor ist ein Behälter zur aeroben oder anaeroben Fermentation und zur Anzucht von Mikroorganismen. In ihm werden Rohstoffe durch das Enzymsystem lebender Mikroorganismen (Bakterien, Hefen und andere Pilze, Algen) Zellen höherer Organismen oder durch isolierte Enzyme in erwünschte Produkte umgewandelt. Dabei sind kontrollierte, steuerbare Zustandsgrößen notwendig, um ein optimales Wachstum bzw. optimale Produktbildung zu gewährleisten. Die Produktions-Bioreaktoren können ein Volumen von 1 - 450 m³ haben.

Stoffwechselphysiologisch kann zwischen den anaeroben und aeroben Prozessen unterschieden werden. Letztere spielen verfahrenstechnisch eine bedeutende Rolle.

Fermenter werden aber nicht nur auf stoffwechselphysiologischer Basis unterschieden, sondern auch im Hinblick auf die Lokalisation der Biomasse. Es gibt Oberflächenreaktoren (Füllkörperreaktoren), bei denen das lebende Material als Biofilm auf einer festen Oberfläche haftet oder auf der Kulturflüssigkeit schwimmt, so dass eine direkte Sauerstoff-Versorgung aus der Luft erfolgt.

Eine weitere Kultivierungsmöglichkeit ist die *Submerskultur*, bei der die Durchmischung der Zellen im Medium stattfindet. Wichtig sind die Steuerung des Fermentationsprozesses, die homogene Durchmischung, die gute Sauerstoff-Versorgung (bei aeroben Fermentern), die gute Wärmeabführung, die reduzierte Schaumbildung, die Vermeidung mechanischer Schädigung der Organismen und die Vermeidung von Kontamination.

Zudem können Fermenter bezüglich ihrer Handhabung in drei Verfahren unterschieden werden. Die *batch*- Fermentation wird als geschlossenes, die *fed-batch*- Fermentation als Zulaufverfahren oder teiloffenes und die *kontinuierliche* Fermentation als offenes System bezeichnet. Die Handhabung hat großen Einfluss auf die Zeitprofile der Substrat- und Produktkonzentration.

Bei einer *fed-batch*-Fermentation werden während der Fermentation phasenweise Medienbestandteile nachdosiert. Dadurch kann zum Beispiel die Phase des Wachstums verlängert werden. Durch diese Verlängerung des Fermentationsprozesses kann eine erhöhte Biomassekonzentration im Fermenter erzielt werden. *Fed-batch*-Prozesse sind für Fermentationen interessant, bei denen Substratinhibierung vorliegt. Auch für katabolit-reprimierte Prozesse, bei denen die Synthese des gewünschten Produktes durch zu hohe Substratkonzentrationen unterbunden wird, ist eine *fed-batch*-Fermentation sinnvoll.

Bei einer *kontinuierlichen* Fermentation (Chemostat) werden stetig Medienbestandteile nachdosiert, da der zu kultivierende Organismus zum Beispiel ohne eine bestimmte Substratkonzentration (Glucose, NaCl-Ionen) kein Zellwachstum aufweist. Das eingespeiste Kulturmedium in den Fermenter entspricht dem entnommenen Probenvolumen. Das Fließgleichgewicht wird erzielt. Die spezifische Wachstums- und Durchflussrate entspricht der abgeführten und zugewachsenen Biomasse. Dieses Verfahren ist für die Erforschung der Kinetik und des Verhaltens eines biologischen Systems (z.B. Enzymaktivität, genetische Stabilität, Einflussfaktoren auf den zellulären Metabolismus) von großem Interesse.

Bei einer *batch*-Fermentation, wie sie dieser Arbeit zugrunde liegt, wird außer Luft, geringen Mengen an Antischaummittel (Polypropylenglycol), Säure oder Base dem Fermenter

nichts hinzugefügt und außer geringen Probenvolumina auch nichts entzogen. Demzufolge kann diese Art der Fermentation als ein geschlossenes System betrachtet werden. Bei der *batch*-Fermentation wird das Nährmedium vorgelegt und mit einer Vorkultur (Kapitel 2.4.2) beimpft. Die Zellen wachsen und vermehren sich, bis eine Limitierung zum Beispiel durch die sich verändernde Substratkonzentration oder durch ein Spurensalz einsetzt und das Wachstum begrenzt. Zudem kann auch die Inhibierung eines im Verlauf der Fermentation gebildeten toxischen Produktes das Wachstum begrenzen und somit eine Limitierung darstellen.

Das Wachstumsverhalten von z.B. Bakterien in einer *Batch*-Fermentation kann anhand von Abbildung 12 beschrieben werden.

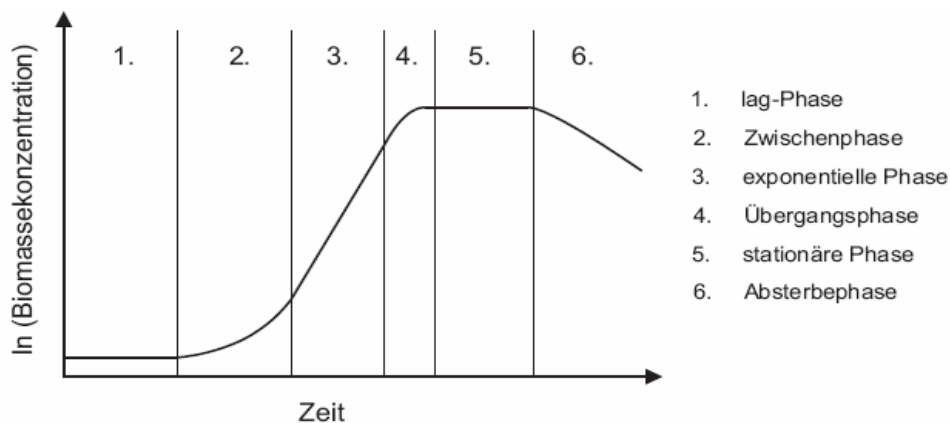


Abb. 12. Wachstumskurve einer batch-Fermentation (Crueger, 1989)

Werden Zellen in frisches Medium überführt, so benötigen sie Zeit, um sich den neuen Kulturbedingungen anzupassen. Die Zellen befinden sich in der *lag*-Wachstumsphase, und Zellwachstum findet nur in geringem Maße statt. Die Dauer der Adaptation an die neuen Kultivierungsbedingungen ist abhängig von den Veränderungen des neuen Wachstumsmediums (z.B. andere Kohlenstoffquelle).

Nach der Adaptation an die Kulturbedingungen beginnt das Zellwachstum. Die Zellen befinden sich nun in der *Zwischenphase*. Anschließend folgt die *exponentielle* oder die *log*-Wachstumsphase. Die Zellen sind optimal an die Kultivierungsbedingungen angepasst und wachsen mit maximaler Geschwindigkeit. Der exponentiellen Wachstumsphase folgt eine *Übergangsphase* mit Substratlimitierung, dass heißt dass eine Verlangsamung des Zellwachstums auftritt. Die Zellen treten anschließend in die *stationäre* Wachstumsphase ein. In dieser Phase ist das Hauptsubstrat (Kohlenstoffquelle) verbraucht. Es findet kein weiteres Wachstum mehr statt. Die in dieser Arbeit angewendete Fermentationsmethode ist eine *Submerskultur* im *batch* Prozess.

1.7 Ziele der Arbeit

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation soll der Einfluss von Quinat als alleinige Kohlenstoffquelle auf das Metabolom des Modellorganismus *Corynebacterium glutamicum* quantitativ und qualitativ mittels gekoppelter Gaschromatographie und Massenspektrometrie untersucht werden.

Dazu sollen zunächst die Kultivierungsbedingungen von *C. glutamicum* auf Quinat in einem 5 L Fermenter etabliert und optimiert werden, um anschließend Proben in verschiedenen Wachstumsphasen generieren zu können, die aus einem Fermentationsansatz stammen.

Ferner soll *C. glutamicum* unter Verwendung von Quinat als Kohlenstoffquelle einem Sauerstoff-limitierten Fermentationsprozess ausgesetzt werden, um die Auswirkungen der Sauerstofflimitierung auf das Metabolom des aeroben Bakterium zu charakterisieren.

Im zweiten Teil sollen die Charakteristiken verschiedener *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme mit Hilfe der Gaschromatographie und Massenspektrometrie analysiert werden.

Dazu sollen zunächst die Wachstumsbedingungen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen für die Wildtypstämme PAO1, TBCF10839 sowie PA14 angepasst und die metabolischen Profile aufgenommen werden, bevor diese im weiteren Verlauf der Arbeit als Referenz fungieren können.

Darüber hinaus sollen fünf Transposonmutanten des Referenzstammes TBCF10839 auf diversen Kohlenstoffquellen inkubiert werden, um Proben sowohl in der exponentiellen als auch stationären Wachstumsphase für die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Analyse zu generieren. Dabei sollte speziell eine Transposonmutante selektiert und detaillierter charakterisiert werden.

Zusätzlich soll die Extraktionsmethode für hydrophobe Metabolite für *P. aeruginosa* etabliert und an dem Referenzstamm TBCF10839 sowie an einer Transposonmutante angewendet werden.

Abschließend sollen die Kultivierungsbedingungen sequentieller *P. aeruginosa*-Isolate von zwei klinischen Cystische Fibrose-Patienten auf einem undefinierten und einem definierten Medium etabliert werden, bevor die Analysen der intrazellulären Metabolitkonzentrationen durchgeführt werden können.

Zusätzlich sollen die metabolischen Profile der Isolate von zwei Patienten entsprechend ihrer Isolation charakterisiert werden, um mögliche Analogien oder Differenzen in ihren Anpassungsstrategien an den Patienten zu ermitteln.

2 Material & Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien, Geräte, Materialien, Software und Datenbanken

Alle Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „pro analysis“ von den Firmen Carl Roth, Merck, Sigma-Aldrich, Fisher Scientific, CS, Fluka und Beckton bezogen, wenn diese keine gesonderte Erwähnung erfahren.

Wasser wurde mittels Reinstwassersystem, GenPure 08.2202 (TKA Wasseraufbereitungssysteme, Niederelbert) destilliert, anschließend bei 121°C für 20 min sterilisiert (Varioklav, Thermo Fisher) und ausschließlich in dieser Form verwendet.

Tab. 1. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
GC-System/ Autosampler AS3000 Gaschromatograph TraceGC	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich
Massenspektrometer Trace (EI/CI-Quadrupol-MS)	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich
Helium-Reinheitssystem Gas-Clean	Varian, Darmstadt
Fermenter Minifors	Infors AG, Bottmingen
Zentrifugen 5417 C, 5418, 5810 R 22R Biofuge	Eppendorf, Hamburg Hettich, Thermo Fisher
Schüttler Certomat R Aquatron	B.Braun Biotech, Melsungen Infors AG, Bottmingen

Tab. 2. Materialien für die Gaschromatographie/ Massenspektrometrie

Bezeichnung	Hersteller
GC-Säule DB5ms 30m*0.25mm*0.25µm	JW Scientific, Folsom (CA)
GC-Liner Glas 105.0*5.0ID*8.0OD mm	Thermo Electron (Finnigan), Dreieich
Septen Thermolite 12.5 mm und 17 mm für Probengläser, 8-ST 101	Restek, Bad Homburg Chromacol, Herts (UK), Kupfer, Pfungstadt

Sonstige Materialien

Deaktivierte Glaswatte
 Probengläser 1.8 ml N8-1
 Mikroeinsatz G30s
 Schraubenkappen 8-SC

Restek, Bad Homburg
 Macherey-Nagel, Düren
 CS-Chromatographie, Langerwehe
 Chromacol, Herts (Uk), Kupfer,
 Pfungstadt

Tab. 3. Software

Software	Hersteller
Xcalibur 1.4 (Thermo Electron (Finnigan), Dreieich)	Instrumentensteuerung und Datenaufnahme
AMDIS 32, Version 2.64 (NIST, Gaithersburg, USA)	Automatische qualitative Auswertung von GC-MS Daten
Processing 4_3 (Sergey Strelkov)	Automatische Auswertung von GC-MS Daten auf Xcalibur Basis
Processing 4_3 (Bernhard Thielen)	Automatische Auswertung von GC-MS Daten auf Xcalibur Basis
Macros 2, Postprocess2 (Sergey Strelkov)	Umwandlung von Xcalibur-Reports in ein übersichtliches Format
Macros 3, Postprocess3 (Bernhard Thielen)	Umwandlung von Xcalibur-Reports in ein übersichtliches Format
eSOMet (Isam Haddad)	Programm zur Darstellung von PCA, ESOM, HCA
CUMETA (Silke Schrader)	Programm zur Zusammenfassung normalisierter Daten

Tab. 4. Datenbanken

Bezeichnung	Hersteller
NIST Mass Spectral Database http://www.nist.gov/	Bibliothek und Programm zur Analyse von GC-MS Spektrum
KEGG http://www.genome.ad.jp/kegg/	Stoffwechselkarten verschiedener Organismen
ChemFinder http://chemfinder.cambridgesoft.com	Physikalische und chemische Eigenschaften von Metaboliten
PubMed http://chemfinder.cambridgesoft.com	Literaturrecherchen
Library 3_4_0 (Sergey Strelkov)	Interne Massenspektrum-Datenbank (definierte Parameter zur Identifikation)
Library 3_6_0 (Bernhard Thielen)	Interne Massenspektrum-Datenbank (definierte Parameter zur Identifikation)

2.2 Medien, Puffer und Lösungen

2.2.1 undefinierte Medien

2.2.1.1 Brain Heart Infusion (BHI) Medium

37,5 g BHI

2.2.1.2 Luria-Bertani (LB)-Medium (1L)

10 g Pepton von Casein
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl

2.2.1.3 Trypton-Medium (1L)

20 g Trypton
10 g NaCl

2.2.1.4 Caseinaminosäure-Lösung (0.25% bzw. 1%)

2.5 g/ 10 g Caseinhydrolysat

2.2.1.1 bis 2.2.1.4 wurden jeweils in 1 L H₂O bidest. Endvolumen gelöst und anschließend autoklaviert. Zur Herstellung von 1 L Festmedium wurden jeweils 15 g Agar-Agar vor dem Autoklavieren zu dem Flüssigmedium gegeben, anschließend in Petrischalen überführt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.2 Allgemeine Lösungen

Tab. 5. Allgemeine Lösungen

Lösungen	Konzentrationen	Sterilisationsart
C ₆ H ₁₂ O ₆	500 g/l / 1M	Sterilfiltration
C ₇ H ₁₂ O ₆	316 g/l	Sterilfiltration
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	25 g/l	Autoklavieren
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 g/l / 1M	Autoklavieren
C ₄ H ₄ O ₄ Na ₂ * 6 H ₂ O	1 M	Sterilfiltration
Citrat	1 M	Sterilfiltration
MgCl ₂	1 M	Autoklavieren
FeSO ₄ x 7H ₂ O	14 mg/ml	Sterilfiltration
NH ₅ (CH ₂) ₅ NH ₂	51 mg/l	Sterilfiltration
C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	100 mM	Sterilfiltration
C ₆ H ₁₁ NO ₂	0.1 mM	Sterilfiltration

2.2.2.1 Biotin-Stammlösung

20 mg $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

Es wurde auf 100 ml H_2O bidest. Endvolumen aufgefüllt, mit 5 Tropfen 1M NaOH zum Lösen alkalisch gemacht, die Lösung sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Natriumchlorid-Lösung (9%)

90 g NaCl

Es wurde auf 1L H_2O bidest. Endvolumen aufgefüllt. Jeweils vor den Versuchen wurde damit eine 0.9%ige Lösung hergestellt.

2.2.2.3 Ribitol

0.2 g $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$

Es wurde in 1L H_2O bidest. gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 Methylnonadecanoate

2g $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{COOCH}_3$

Methylnonadecanoate wurde in 1L Chloroform Endvolumen gelöst.

2.2.2.5 Alkanmix

Tab. 6. Alkanmix

Alkan	Menge
Decan	17.12 μl
Dodecan	16.67 μl
Pentadecan	16.23 μl
Nonadecan	12.50 mg
Docosan	12.50 mg
Octacosan	12.50 mg
Dotriacontan	12.50 mg
Hexatriacontan	12.50 mg

Die Bestandteile wurden in 20 ml Cyclohexan gelöst und anschließend auf 25 ml Cyclohexan aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden nach der Derivatisierung zu jeder Probe 4 μl / 6 μl hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben gemischt und nach einer Zentrifugation von 3 min bei 14000 rpm in Probengläser mit Einsätzen für kleine Volumen überführt.

2.2.2.6 Spurensalzlösung für MM1-Medium

Tab. 7. Spurensalzlösung für MM1-Medium

Salz	Menge g/L
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	28.5
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	16.5
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	6.4
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0.764
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.128
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0.044
Na ₂ Mo ₄ * 2 H ₂ O	0.064
H ₃ BO ₃	0.048
SrCl ₂ * 6 H ₂ O	0.050
BaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.050
KAL(SO ₄) ₂ * 12 H ₂ O	0.028

Es wurde auf 1L H₂O bidest. Endvolumen aufgefüllt, mit 3M H₂SO₄ einen pH- Wert von 1.0 eingestellt und sterilfiltriert.

2.2.2.7 Spurensalzlösung für A10-Medium

Tab. 8. Spurensalzlösung für A10-Medium

Salz	Menge g/l
CaSO ₄ * 2H ₂ O	0.2
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ * H ₂ O	0.02
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.02
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.01
H ₃ BO ₃	0.005

Es wurde auf 1 L H₂O bidest. Endvolumen aufgefüllt und die Lösung sterilfiltriert.

2.2.3 Minimalmedien (MM)

2.2.3.1 MM1-Grundstamm-Medium

Tab. 9. MM1-Grundstamm-Medium

Salz	Menge g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
(NH ₄) ₂ CO	5
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	2

Es wurde auf 947ml H₂O bidest. aufgefüllt und mit 5M KOH auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt. Das Medium wurde anschließend autoklaviert.

2.2.3.2 Fermentationsmedium

Tab. 10. Komposition der Fermentationsmedien (1 L)

	2.2.3.1	pH-Wert	100-fach MgSO ₄ * ¹	1000-fach CaCl ₂ * ¹	1000-fach Biotin * ¹	1000-fach Spurensalzlg.* ¹	Stocklg. C-Quelle* ¹
Glucose	947.0 ml	7	10 ml	1 ml	1 ml	1 ml	40.0 ml
Quinat	924.5 ml	7	10 ml	1 ml	1 ml	1 ml	62.5 ml

Die Medien wurden stets vor jeder Fermentation frisch zusammenpipettiert. Die Zugabe, der mit *¹ markierten Bestandteile, erfolgte nach Autoklavieren des Fermenters.

2.2.3.3 AB-Medium

Tab. 11. AB-Medium

Bestandteil	Menge ml/l
A10-Lösung	100
1M Kohlenstoffquelle	40
1M CaCl ₂	0.1
1M MgCl ₂	1
14mg/ml FeSO ₄ x 7H ₂ O	0.5
Spurensalze	1

Das Medium wurde frisch angesetzt und auf 1 L H₂O bidest. Endvolumen aufgefüllt. Zur Herstellung von 1 L Festmedium wurde 15 g Agar-Agar vor dem Autoklavieren in 800 ml H₂O bidest. gegeben. Nach Abkühlen auf 65°C erfolgte die Zugabe der noch fehlenden Komponenten des Mediums aus Tabelle 12. Anschließend wurde das Medium in Petrischalen aufgeteilt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.3.4 A10-Lösung

Tab. 12. A10-Lösung

Salz	Menge g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20
Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O / H ₂ O frei	90/ 40
KH ₂ PO ₄	30
NaCl	30

Das Medium wurde auf 1 L H₂O bidest. Endvolumen aufgefüllt und autoklaviert.

2.3 Bakterienstämme

Tab. 13. Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

Stamm / Entnahmedatum	Eigenschaften	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Referenzstamm	Kalinowski et al., 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :		Wiehlmann, MHH
PAO1	Referenzstamm	Holloway, 1955
PA14	Klinisches Isolat, MHH	Wiehlmann, MHH
TBCF10839	Klinisches Isolat, MHH	Wiehlmann, MHH
D8A6, PA1436, PA1572, PA5349, PA4640	Transposonmutante	Wiehlmann, MHH
Pat1A (15.04.1986) Pat1B (31.05.1995) Pat1C (19.01.2002)	Klinisches Isolat MHH	Wiehlmann, MHH
Pat2A (29.01.1985) Pat2B (07.08.1990) Pat2C (23.06.1998)	Klinisches Isolat MHH	Wiehlmann, MHH

2.4 Kultivierung von Mikroorganismen

2.4.1 Bestimmung der Bakteriendichte

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkulturen wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektralphotometer verfolgt. Als Referenz diente steriles Nährmedium.

2.4.2 Bestimmung des spezifischen Wachstums

Das spezifische Wachstum der exponentiellen Wachstumsphase kann näherungsweise mit folgender Gleichung bestimmt werden

$$\mu = \frac{\ln(OD t_1) - \ln(OD t_0)}{t_1 - t_0} \quad [1]$$

Die spezifische Wachstumsrate wird in der Einheit h^{-1} angegeben.

Die Verdopplungszeit ergibt sich durch $\frac{\ln 2}{\mu}$ und trägt die Einheit h. [2]

2.4.3 *C. glutamicum*

2.4.3.1 Ausstrich auf Platten

Für die BHI-Festplatten wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 in 20 ml flüssigem BHI-Medium inkubiert. Dies erfolgte in einem 100 ml Kolben für 7 Stunden bei 30°C (180 rpm). Anschließend wurde mit einem Glasstab das bewachsene Medium auf einer BHI-Festplatte ausgestrichen. Nach Anwachsen der Kulturen bei 30°C wurde die Platte mit Parafilm verschlossen und somit vor Austrocknen geschützt bei 4°C gelagert.

2.4.3.2 BHI-Kultur

20 ml BHI-Medium wurden mit dem Wildtyp-Stamm ATCC 13032 von *C. glutamicum*, der zuvor auf einer BHI-Festplatte gezüchtet wurde, in einem 100 ml Kolben angeimpft und für sieben Stunden bei 30°C und 180 rpm kultiviert.

2.4.3.3 Übernachtskultur

Für die Adaptation des Organismus auf die Bedingungen des Minimalmediums wurde eine MM-Übernachtskultur (20 ml) mit Glucose (20 mM) angesetzt. Anschließend wurde mit 1 ml der inkubierten BHI-Kultur angeimpft und bei 30° C (180 rpm) über Nacht auf einem Schüttler kultiviert. Diese Übernachtskultur wurde für die Kultivierung in 500 ml Schikanekolben verwendet. Sie sollte nach 15 Stunden eine OD₆₀₀ von 20-30 aufweisen. Bei den Übernachtskulturen für 3 L-Fermentationen, wurden 4* 50 ml Medium in Schikanekolben benötigt.

2.4.3.4 Hauptkultur

Für die Vorversuche zur Etablierung der Wachstumsbedingungen wurden Fermentationen in kleinem Maßstab angesetzt. Dafür wurde die MM1-Hauptkultur (20 ml) mit der mit MM1-Grundstamm-Lösung für die jeweiligen Kulturbedingungen gewaschenen Übernachtskulturen auf OD₆₀₀ 1 angeimpft. Die Hauptkultur wurde anschließend bei 30°C (180 rpm) inkubiert. Das Wachstum im Laufe der Kultivierung im 500 ml-Schikanekolben wurde mit Hilfe von OD-Bestimmungen (OD₆₀₀) und der daraus resultierenden Wachstumskurve verfolgt. Eine OD₆₀₀ von 1 korrespondiert mit 1*10⁹ Zellen pro Milliliter. Proben mit einer OD₆₀₀ > 1 wurden 1/10 in dem korrespondierenden Medium für die Messung verdünnt.

2.4.3.5 Fermentation

Vorbereitung des Fermenters

Einen Tag vor der Fermentation musste der 5 L Fermenter für eine 3 L Fermentation vorbereitet werden. Die Vorbereitungen des Fermenters für die unterschiedlichen Fermentationsbedingungen glichen sich. Dafür wurde jeweils die dreifache Menge des MM1-Mediums angesetzt und durch Zugabe von 5M KOH auf pH 7.0 eingestellt und in den Fermenter überführt. Zunächst wurde mit der pH-Elektrode des Fermenters mit den Standardpuffern (pH 7.0/ 9.0) eine 2-Punkt-Kalibrierung durchgeführt und anschließend in den Fermenter eingeführt. Nachfolgend fand eine Kontrolle des pH-Wertes mit dem sich im Fermenter befindlichen Medium statt. Zusätzlich wurde eine pO₂ -Elektrode in den Fermenter eingeführt. Bevor dieser autoklaviert wurde, mussten sensible Teile wie Elektrodenanschlüsse, Filter und Rührerkopf mit Aluminiumfolie umwickelt werden. Nach dem Autoklavieren wurde die pO₂-Elektrode an den Fermenter angeschlossen und über Nacht polarisiert. Die Heizung, der Wasserab- und -zulauf und der Rührer mussten über Nacht laufen, um optimale Startbedingungen zu gewährleisten. Am Tag vor jeder Fermentation wurde morgens eine BHI-Kultur (2.4.2.2) und abends viermal die Übernachtskultur (2.4.2.3) á 50 ml MM1-Medium angesetzt, um am Tag der Fermentation eine ausreichende Anzahl von Zellen zu erhalten, damit der Fermenter auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft werden konnte.

Fermentationsparameter

Tab. 14. Fermentationsparameter einzelner Fermentationsbedingungen

	Start-pH-Wert	pH-Wert Kontroll-Bereich	Säure	Base	pO ₂ -Wert %	Temperatur °C
Glucose/Quinat	7	6.9-7.1	3M H ₂ SO ₄	3M NaOH	30%	30°C

Folgende Parameter mussten vor jeder Fermentation beachtet und eingestellt werden.

Animpfen des Fermenters

Vor dem eigentlichen Animpfen des Fermenters mit der Übernachtskultur erfolgte die Kalibrierung der pO₂-Elektrode mit Luft. Anschließend wurden, je nach Fermentation, die in Tab. 10 mit *¹ angegebenen Lösungen in den Fermenter injiziert und die Medien mittels Säure 3M H₂SO₄ oder Base 3M NaOH auf den gewünschten pH-Wert von 7.0 titriert. Bevor der Fermenter mit der Übernachtskultur angeimpft wurde, mussten die Zellen mit dem MM1-Medium der jeweiligen Fermentation zweimal gewaschen werden. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen in 25 ml des entsprechenden Grundstammediums resuspendiert und über ein Septum in den Fermenter geleitet.

2.4.4 *P. aeruginosa*

2.4.4.1 Ausstrich auf Platten

Für die Festmedien wurde *P. aeruginosa* aus Glycerin-Stocks, die bei -80°C gelagert wurden, mit einer Impföse ausgestrichen. Nach Anwachsen der Kulturen (37°C) wurde die Platte mit Parafilm verschlossen und somit bei 4°C vor Austrocknung geschützt gelagert.

2.4.4.2 Übernachtskultur

Für die Adaptation des Organismus auf Minimal- bzw. Vollmedium wurde eine Übernachtskultur angesetzt. 20 ml des entsprechenden Mediums wurden mit den entsprechenden Stämmen, die zuvor auf den jeweiligen Festmedien gewachsen sind, in einem 100 ml Schikanekolben angeimpft und 14 Stunden (37°C, 200 rpm) im Wasserschüttler kultiviert.

2.4.4.3 Hauptkultur

Die Hauptkultur wurde in 500 ml Schikanekolben mit 150 ml Medium und einer Start-OD von 0.05 angesetzt und im Aquatron bei 37°C (200 rpm) inkubiert. Das Wachstum wurde mit Hilfe von OD-Messungen und der daraus resultierenden Wachstumskurve verfolgt. Eine OD₆₀₀ von 1 korrespondiert mit $1 \cdot 10^9$ Zellen pro Milliliter. Proben mit einer OD₆₀₀ > 1 wurden 1/10 in dem korrespondierenden Medium für die Messung verdünnt.

2.5 Probenvorbereitung und Metabolitextraktion

2.5.1 Zellernte

2.5.1.1 Fermenter

Vor einer Probenentnahme wurde die Zelldichte anhand der OD bestimmt. Die Probe wurde über das Probenentnahmerohr mit einer Spritze abgezogen. Das Volumen der Probe wurde der aktuellen OD angepasst, so dass konstant $5 \cdot 10^{10}$ Zellen geerntet wurden. Lag die OD der Kultur unter 4, so wurde die entnommene Zellmenge pro Probe auf die Hälfte reduziert, da dem Fermenter ansonsten zu viel Volumen entnommen worden wäre. Die Zellen wurden zum Entfernen des Mediums in Zentrifugen-Röhrchen (6000 rpm, 3 min, 4°C) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen, resuspendiert und zentrifugiert (6000 rpm, 3 min, 4°C).

2.5.1.2 Kolben

Für die Extraktion der Metabolite der hydrophilen Phase bei *P. aeruginosa* wurden 150 mg Biofeuchtmasse der entsprechenden OD₆₀₀ verwendet. Die jeweilige Menge an Zellen wurde zum Entfernen des Mediums in Zentrifugen-Röhrchen 5 min bei 6000 rpm (4°C) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 2 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung (4°C) gewaschen, resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 6000 rpm, 4°C).

2.5.2 Zellaufschluss

Nach dem letzten Waschschrift wurde die restliche NaCl-Lösung mit einer Pipette entfernt. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml MeOH + 40 µl/ml Ribitolösung (0.2 g/L) resuspendiert (bei halbierten Zellmenge 0,75 ml MeOH + 20 µl/ml Ribitolösung) und für 15 min bei 70°C im Ultraschallbad lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate für 2 min auf Eis abgekühlt.

2.5.3 Metabolitextraktion

2.5.3.1 Hydrophile Phase

Im Anschluss an den Zellaufschluss folgte die Extraktion polarer Metabolite. Dabei wurden 1,5 ml H₂O bidest. zu den Proben gegeben (0,75 ml bei reduzierter Zellmenge) und jede Probe für 60 sec intensiv durchmischt. Zum MeOH-H₂O-Gemisch wurde 1 ml Chloroform (0,5 ml bei reduzierter Zellmenge) bei *C. glutamicum* / 1.5 ml CHCl₃ bei *P. aeruginosa* pipettiert und wieder für 60 sec intensiv gemischt. Die Proben wurden zur Phasentrennung 6 min / 10 min (6000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Im Anschluss wurde 1 ml / 2 ml der oberen, polaren Phase (MeOH-H₂O-Gemisch) in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 Stunde im Konzentrator mit Rotation abgedampft, um das Methanol zu entfernen. Ferner wurden diese ohne Rotation vollständig getrocknet. Dies wurde ohne Rotation betrieben, damit sich die Proben auf der Gefäßwand verteilen. Die vollständig getrockneten Proben wurden entweder mit Parafilm verschlossen und bei -20°C gelagert oder derivatisiert.

2.5.3.2 Hydrophobe Phase

Sollte die Extraktion der hydrophoben Phase sowie der darin enthaltenen Metabolite inspiziert werden, erfolgte dies anhand der nachstehenden Fließschemata, die sich in ihrer Extraktionsprozedur und den verwendeten -lösungen unterschieden.

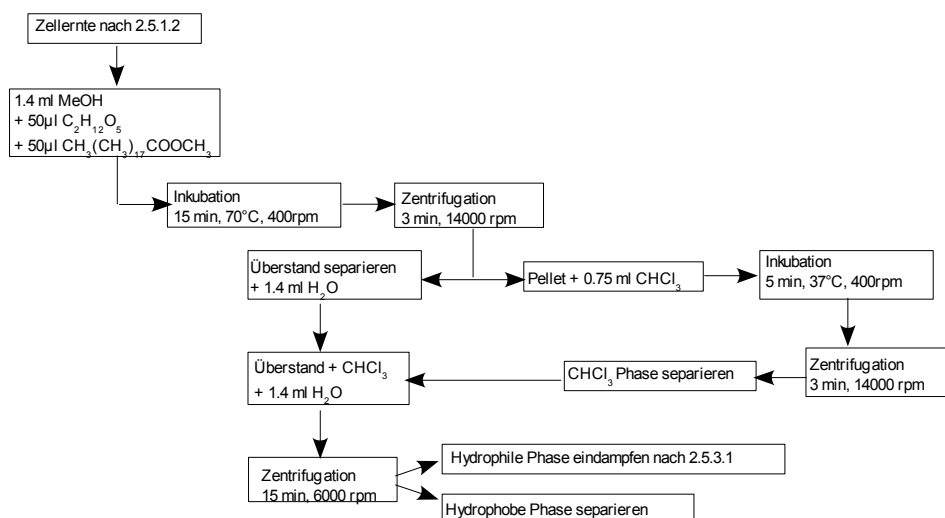
Extraktionsmethode 1:

Abb. 13. Extraktionsmethode 1: Gleichzeitige Extraktion hydrophiler sowie hydrophober Phase

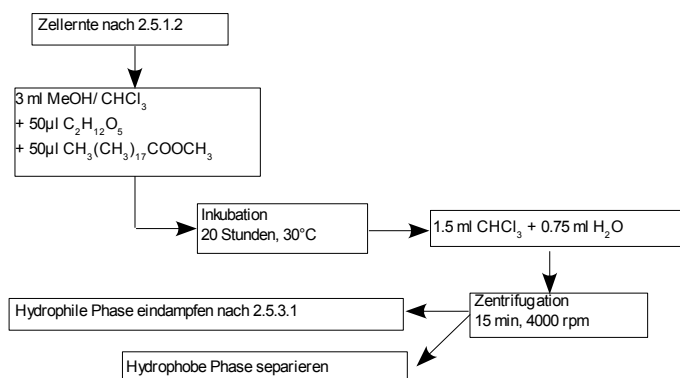
Extraktionsmethode 2:

Abb. 14. Extraktionsmethode 2: Extraktion hydrophiler und hydrophober Phase

Bei den Extraktionsmethoden 1 und 2 folgten weitere gemeinsame Aufarbeitungsschritte, die in Abbildung 15 in einem zusätzlichen Fließschema dargestellt sind.

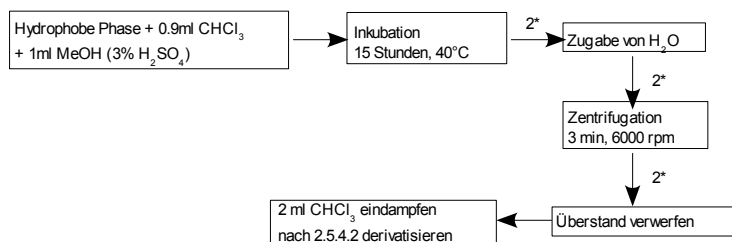
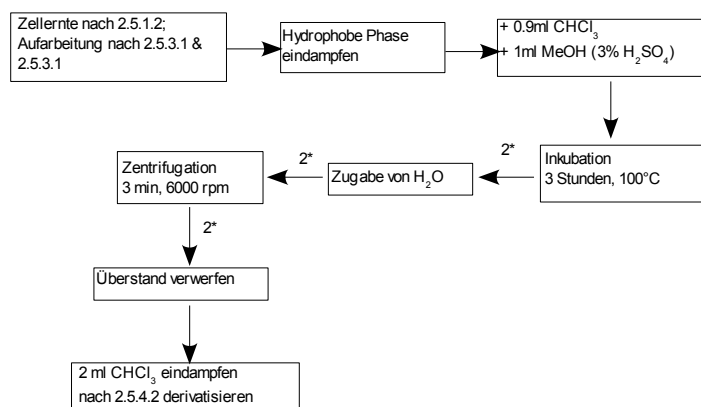


Abb. 15. Gemeinsame Aufarbeitung der hydrophoben Phase aus Extraktionsmethode 1 und 2

Extraktionsmethode 3:**Abb. 16.** Extraktionsmethode 3**2.5.4 Derivatisierung****2.5.4.1 Hydrophile Phase**

Nach einer Lagerung bei -20°C wurden die Proben zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, bevor der Parafilm entfernt wurde. Die Proben wurden offen in der SpeedVac für 30 min nachgetrocknet, um das für die Derivatisierung schädliche Kondenswasser zu entfernen. Zu den vollständig getrockneten Proben wurden 20 µl / 50µl Pyridin mit Methoxyamin (20 mg/ml) gegeben und für 90 min bei 30°C auf einem Thermomixer (600 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 32 µl / 80 µl MSTFA zupipettiert und die Proben für 30 min bei 37°C auf dem Thermomixer (600 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Proben für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Thermomixer inkubiert.

2.5.4.2 Hydrophobe Phase

Nach einer Lagerung bei -20°C wurden die Proben zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, bevor der Parafilm entfernt wurde. Die Proben wurden offen in der SpeedVac für mindestens 30 min nachgetrocknet, um das Kondenswasser restlos zu entfernen. Zu den vollständig getrockneten Proben wurden 60 µl Cyclohexan, 10 µl Pyridin und 10 µl MSTFA gegeben und 30 min bei 37°C und 600 rpm auf dem Thermomixer inkubiert.

2.6 GC-MS - Messung

Die Messung der Proben erfolgte im GC-MS mit der Methode „CoryPTV“ (Strelkov et al., 2004). Zur Analyse wurde ein System aus einem AS 3000 Autosampler, einem Finnigan

Trace Gaschromatographen und einem Trace Massenspektrometer (alle von ThermoFinnigan, San Jose, USA) verwendet. Diese wird im Folgenden detailliert beschrieben.

Die Injektion in den Gaschromatographen erfolgte über einen PTV (*programmed temperature vaporizer*) - Injektor mit einem *Silcosleeve Liner* (Restek GmbH, Deutschland). Bei der PTV-Einspritzung wurde die Probe indirekt, das heißt über eine Verdampfungskammer im Split-Modus (Split Ratio 1:25) überführt. Diese Art der Einspritzung ist für temperaturlabile Substanzen besonders gut geeignet, da durch sie die Analyten bei einer möglichst geringen Temperatur verdampft werden. Der Temperaturgradient muss steil sein, damit der Gesamtzeitraum der Injektion nicht zu einer Verzögerung in der Analyse führt. Die Analyse war eine *split injection*, das heißt, dass nur ein kleiner Teil (1/25) auf die Säule gelangte, der Rest wurde mit dem Lösungsmittel abgedampft.

2 µL der Probe wurden bei 70°C eingespritzt und nach 0,2 min. mit einer Temperaturerhöhung von 14°C/s verdampft bis eine Endtemperatur von 280°C erreicht war. Die Temperatur wurde zum Ausheizen des Liners für 5 min gehalten. Die verwendete GC-Säule DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, USA) war eine sogenannte *Fused-Silica*-Säule, eine Polysiloxan-Säule, die zu 95% Dimethyl- und zu 5% Diphenylgruppen trug und laut Herstellerangaben besonders stabil gegen Pyridin und Silylierungsmittel war. Der geringe Austrag von Säulenmaterial (Säulenbluten) auch bei hohen Temperaturen verbessert die spätere Analyse, da dieses zum Signalrauschen beiträgt und die Detektionsgrenzen limitiert (Hübschmann, 2001). Die Säule weist eine Länge von 30 m, einen Durchmesser von 0,25 mm und eine Filmdicke der stationären Phase von 0,25 µm auf.

Die Temperatur der Säule wurde zunächst für 1 min bei 70°C gehalten, dann mit 1°C/min auf 76°C erhöht und nachfolgend der Heizprozess mit 6°C/min bis 325°C fortgesetzt. Die Endtemperatur wurde für 10 min gehalten, woraufhin eine Abkühlung auf 70°C innerhalb von 90 sec erfolgte (Abb. 17). Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt.

Im Massenspektrometer erfolgte dann die Ionisierung durch Elektronenstoß-Ionisation (EI) bei 70 eV (Kapitel 1.2.2). Der Detektor hatte eine Spannung von 500 V und einen Emissionswert von 150 µA bei einer Quelltemperatur von 220°C. Die Betriebsparameter des MS wurden vor jeder Messreihe unter Verwendung der Kalibrationssubstanz Perfluorotri-N-butylamin optimiert. Die Messdaten wurden mit der *Xcalibur* Software 1.2 (ThermoFinnigan, USA) aufgenommen.

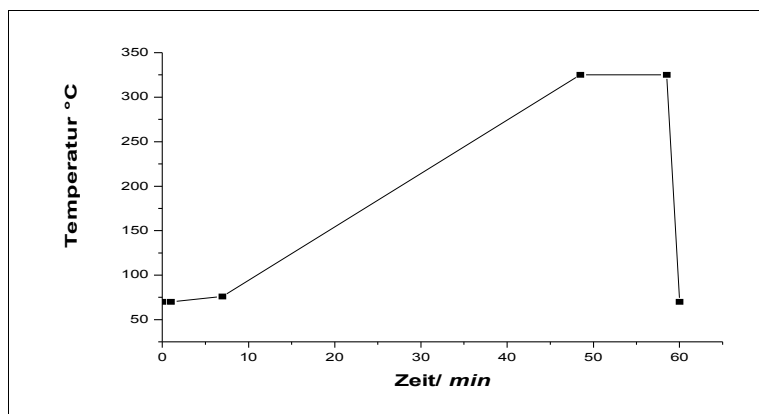


Abb. 17. Bei der Gaschromatographie verwendetes Temperaturprofil

2.7 Nachprozessierung und Auswertung der GC-MS Chromatogramme

2.7.1 Identifizierung

Die Identifizierung wurde anhand des Retentionsindex und Massenspektrums durchgeführt. Die für *C. glutamicum* verwendete Bibliothek war *Library 3_4_0* (Strelkov, 2004). Für *P. aeruginosa* wurde eine von Thielen (2007) weiterentwickelte Bibliothek (*Library 3_6_0*) angewendet. Die Bibliothek *hydrophobic_1_0_0* fand Verwendung bei den hydrophoben Extrakten. Nachfolgend werden die einzelnen Teile der Identifizierung näher beschrieben. Die Kalibrierung der Proben erfolgte über die Zugabe einer Mischung von Alkanen (vgl. Kap. 2.2.5). Den einzelnen Alkanen der Mischung wird ein Retentionsindex zugeordnet (Kohlenstoffanzahl multipliziert mit 100). Bei einer Identifizierung wird den zu analysierenden Substanzen ebenfalls ein Retentionsindex zugewiesen. Über die Berechnung des Retentionsindex können Verschiebungen von Retentionszeiten ausgeglichen werden, die z.B. durch leicht veränderte Säulencharakteristika nach einer im Routinebetrieb häufig notwendigen Kürzung der Kapillarsäule verursacht werden. Der Retentionsindex wird bei der Nutzung von Temperaturprofilen wie folgt berechnet:

$$I^{(T)} = 100 \left[(y-x) \frac{t_i - t_x}{t_y - t_x} + x \right] \quad [3]$$

- I = Retentionsindex nach Kováts
- T = Im Temperaturgradienten
- x = Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans vor der unbekannten Substanz
- y = Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans nach der unbekannten Substanz
- t_i = Retentionszeit der unbekannten Substanzen
- t_x = Retentionszeit des Alkans vor der unbekannten Substanz
- t_y = Retentionszeit des Alkans nach der unbekannten Substanz

2.7.1.1 Amdis32 & XCalibur

Zunächst erfolgte eine Berechnung des Retentionsindices anhand der in den Proben enthaltenen Alkane (Tab. 15), die als Zeitstandards dienen. In der folgenden Tabelle sind die Sollwerte für die einzelnen Alkane aufgelistet:

Tab. 15 Für die Kalibrierung verwendete n-Alkane, ihr Retentionsindex und ihre ungefähre Retentionszeit

Alkan (Anzahl C-Atome)	Retentionsindex	Retentionszeit (±1) [min]
Decan (C ₁₀)	1.000	7
Dodecan (C ₁₂)	1.200	13
Pentadecan (C ₁₅)	1.500	21
Nonadecan (C ₁₉)	1.900	28
Docosan (C ₂₀)	2.000	33
Oktacosane (C ₂₈)	2.800	41
Dotriacontane (C ₃₂)	3.200	45
Hexatriacontane (C ₃₆)	3.600	49

Es erfolgte ein Abgleich der beobachteten Peaks bei den jeweiligen m/z-Verhältnissen an den dazugehörigen Retentionszeiten mit Datenbankeinträgen. Anschließend wurde mittels dem von NIST entwickelten Programm `AMDIS` (*the automated mass spectral deconvolution and identification system*) eine Dekonvolution durchgeführt. Dekonvolution steht für die Auftrennung überlappender Einzelpeaks, die anschließend für die Datenbanksuche verwendet werden können. Der Einsatz von AMDIS diente der Identifikation der Metabolit-derivate. Die quantitative Bestimmung dieser erfolgte unter Anwendung von *Xcalibur*. Sie wurde durch die Integration der nach der Dekonvolution vorliegenden Peakintegrale erreicht. Die Parameter für die quantitative Prozessierung mit AMDIS sind in Tabelle 43 (S.213) aufgelistet. Allerdings wird im Folgenden separat auf einige Parameter näher eingegangen.

Sollten mehrere Dateien gleichzeitig ausgewertet werden, wurde der Parameter unter „*Settings-Type of analysis*“ auf „*Use RI Calibration Data*“ umgestellt, abgespeichert und die Datenanalyse gestartet. Die Ergebnisse der qualitativen Datenanalyse wurden in eine .txt-Datei exportiert und die anschließend mit dem Programm „Prozessing 4“ (Strelkov, 2004) detektierten Komponenten automatisch durch die Nutzung spezifischer Massenspuren quantifiziert. Nachdem die Daten das Programm durchlaufen hatten, wurde die automatisch erstellte *sample*-Liste als .sld-Datei im *QuanBrowser* von *Xcalibur* geöffnet. Die Integrale unterhalb der Peaks wurden geprüft und ggf. manuell korrigiert (Abb. 18).

Nach der Korrektur wurde ein Report (*Long Excel Report*) mit den korrigierten Daten (.XQN-File) erzeugt und mittels Excel-Macros (Macros3.xls) in einer Tabelle zusammengefasst. Um während der Extraktion auftretende Volumenunterschiede auszugleichen, wurden die Daten anhand der enthaltenen Kalibriersubstanz Ribitol normiert. Zusätzlich wurden die Integrale der Derivate, die zu der selben Substanz gehörten, aufaddiert.

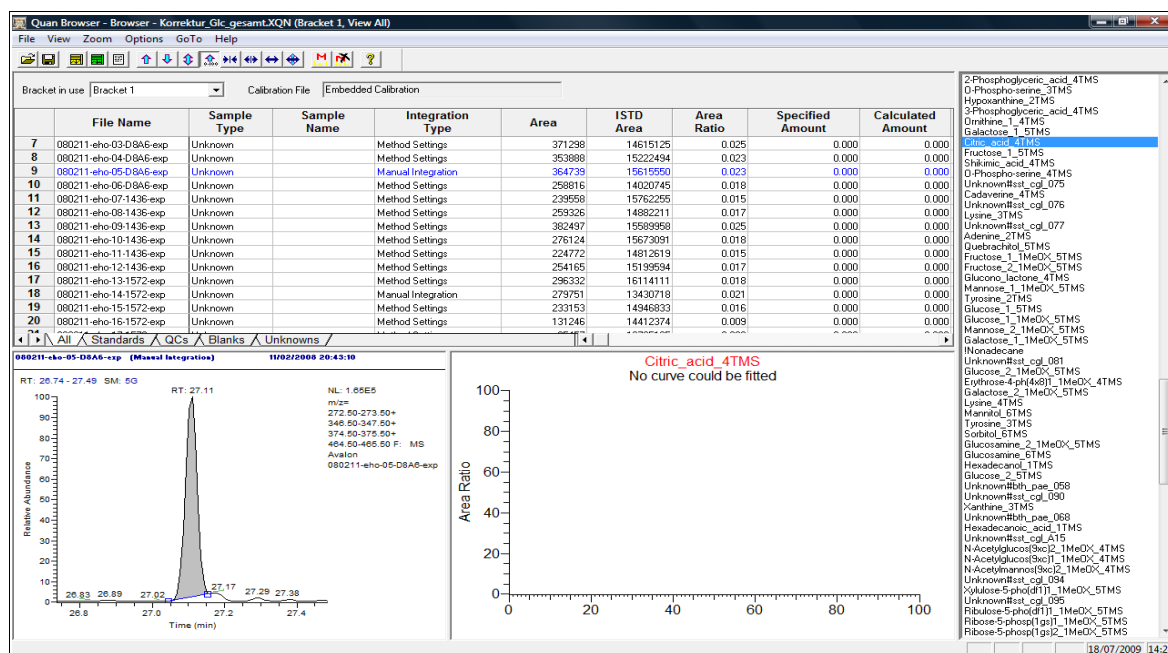


Abb. 18. QuanBrowser 1.2 (Xcalibur). In der *File Name* Spalte befinden sich alle Proben. Darunter sind die zu der Substanz, die in der rechten Spalte gelistet sind, gehörenden Massenspuren zusammen mit der annotierten Fläche (grau) zu erkennen.

2.7.1.2 Validierung der Annotationen von *C. glutamicum* und *P. aeruginosa*

Die Validierung von Annotationen in *C. glutamicum* und *P. aeruginosa* wurde mit Hilfe des in unserer Arbeitsgruppe von Susanne Quester entwickelten *EnzymeDetector* (persönliche Mitteilung von Frau Susanne Quester) durchgeführt. Dieser vergleicht und kombiniert Genomannotationen verschiedener Datenbanken (z.B. NCBI, KEGG, PEDANT) und führt eine aktuelle BLAST-Suche (Johnson et al., 2008) für jedes Gen des Organismus gegen die gesamte Uniprot-Datenbank durch. Das Auswerten der BLAST-Ergebnisse erfolgt anschließend nach den drei Kriterien der Vollständigkeit der EC-Nummern, bester e-value und Häufigkeit der EC-Nummern unter allen BLAST-Hits für jedes Gen. Daraus resultiert ein Wert für die Gen/Enzym-Kombination, wenn die *Input*-Datenbank dieses Enzym annotiert hat, wenn das Evaluationsprogramm diese Annotation vorschlägt oder wenn das Enzym, basierend auf BRENDA/AMENDA (Schomburg et al., 2002), präsent ist. Die Summe aller Werte (Relevanz) reflektiert die Qualität der

Annotation. Der *EnzymeDetector* fungiert als Entscheidungshilfe, die auf statistischen Auswertungen und Sequenzvergleichen beruht.

Der *EnzymeDetector* kommt in dieser Arbeit nicht nur bei der Microarray Daten Analyse für *P. aeruginosa*, sondern auch bei der Enzymverifizierung von *C. glutamicum* (vgl. Kap 3.1.1, Abb. 21) zur Anwendung.

2.8 Chemometrische Datenanalyse und Statistik

2.8.1 Fehlerrechnung

Aus einer Reihe von n verschiedenen Messungen einer Messreihe wurde das arithmetische Mittel aller Messwerte berechnet. Der Mittelwert \bar{x} stellt den wahrscheinlichsten Wert der Messreihe dar.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [4]$$

Der mittlere Fehler der Einzelmessung, auch *Standardabweichung* s, ist ein Maß für die Abweichung des Einzelmesswertes x_i vom Mittelwert \bar{x} .

$$s = \pm \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2} \quad [5]$$

In den meisten Fällen ist die Genauigkeit des arithmetischen Mittels von Interesse. Der mittlere Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ ist um den Faktor $1/\sqrt{n}$ kleiner als die Standardabweichung s und gibt das Intervall um den Mittelwert herum an, indem der wahre Wert einer Größe x erwartet werden kann.

$$s_{\bar{x}} = \pm \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad [6]$$

Voraussetzung war, dass alle Messresultate x_i voneinander unabhängig waren und gleiche Genauigkeit aufwiesen.

Der relative Fehler s_{rel} repräsentiert die Präzision des Messverfahrens.

$$s_{rel} = \pm \frac{s_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad [7]$$

Um chemometrische Analysen der semiquantitativen Daten von *C. glutamicum* und *P. aeruginosa* vorzunehmen, wurden verschiedene statistische Methoden und Programme angewendet.

2.8.2 CUMETA - CUBIC Metabolome Data Analysis Tools

CUMETA (Schrader) ist ein Software – Tool, das in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schomburg in Köln von Silke Schrader speziell für die Metabolomanalyse von Zeitreihen entwickelt wurde. Es wurde in Python geschrieben und ist für Linux- und Microsoft Windows-Plattformen kompatibel. Der Benutzer kann zwischen diversen Modulen wählen:

- Mittelwert-Kalkulationen und Qualitätsanalyse von Wiederholungsexperimenten
- Normalisierungsmethoden
- Vergleich zwischen gemeinsamen und nicht-gemeinsamen Metaboliten verschiedener Experimente
- Kalkulation zwischen Korrelationskoeffizienten zwischen Metaboliten und Experimenten (Pearson und Spearman Rank)
- Vergleich von Korrelationskoeffizienten zwischen verschiedenen Experimenten
- Kalkulation und Vergleich von Metabolitverhältnissen
- Kalkulation von Co-Response Werten (Verhältnis von Metabolitdifferenzen infolge einer Störung wie Mutation oder eines abiotischen Wechsels)
- Kalkulation lokaler und globaler Varianz in Zeitreihenexperimenten
- Sortieren von Ergebnissen entsprechend ihrer Klassifikation zu verschiedenen Stoffwechselwegen, basierend auf KEGG-Informationen.

Diese Module können allein oder in Kombination verwendet werden. Zusätzlich können noch Schwellenwerte eingesetzt werden, um lediglich signifikante Werte zu erhalten.

2.8.3 eSOMet (emergent self-organizing maps)

eSOMet (Haddad et al., 2009) ist ein Programm, welches in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Jahn in Braunschweig von Isam Haddad entwickelt wurde. Es wurde speziell für auf Hochdurchsatz-basierten Metabolomdaten entwickelt und ermöglicht die Detektion hierarchischer Beziehungen innerhalb verschiedener metabolischer Muster unter variierenden Konditionen.

Der Workflow der Analyse-Pipeline weist folgende Struktur auf:

- Akquisition der multivarianten GC-MS-Daten.

- Normalisierung und Reduktion des Datensatzes durch Applikation einer Hauptkomponentenanalyse (PCA – principal component analysis).
- Clustern experimenteller Proben gemäß ihrer Ähnlichkeiten mittels hierarchischer Clusteranalyse (HCA) oder *emergent self-organizing maps* (ESOMs).
- Aus der HCA und den ESOMs resultiert jeweils ein Dendrogramm, das die Beziehungen metabolischer Muster jeder experimentellen Probe repräsentiert.
- Verschiedene Äste des Dendrogramms repräsentierten ausgeprägte Wachstumsbedingungen, die selektiert und für metabolische Veränderungen statistisch evaluiert werden können.
- Die Veränderung der Rate der Metabolitkonzentrationen und ihre statistischen Signifikanzen werden anhand von den in KEGG implementierten metabolischen Stoffwechselkarten mittels Farbcodes dargestellt.

2.8.4 Varianzanalyse (ANOVA)

Varianzanalysen sind datenanalytische, mustererkennende statistische Verfahren. Die Varianzanalyse ANOVA (one-way Analysis of Variance) ist die gebräuchlichste Technik zur Bestimmung signifikanter Differenzen in Mittelwerten diverser (drei oder mehr), selbst eingeteilter Gruppen. Anhand der ANOVA, die in Tigr Mev implementiert ist, kann unterschieden werden, ob die Varianzen zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Dies erfolgt durch die integrierte Clusteranalyse, die ähnliche Metabolit-Varianzen mittels der Distanzfunktionen K-means und der euklidischen Distanz gruppiert. So ermitteln Varianzanalysen, ob die vorgenommene Gruppeneinteilung sinnvoll war oder inwieweit sich die Gruppen signifikant unterscheiden, z.B. Wildtypen von Mutanten.

2.8.5 Hauptkomponentenanalyse PCA (Principal Component Analysis)

Die Hauptkomponentenanalyse wurde von Karl Pearson 1901 (Pearson, 1901) eingeführt und in den 1930er Jahren von Harold Hotelling weiterentwickelt.

Die zentrale Idee einer Hauptkomponentenanalyse ist die Reduktion der Dimensionalitäten der Datensätze, die aus einer großen Anzahl von zusammenhängenden Variablen bestehen. Durch die Reduktion der Datensätze soll erreicht werden, diese zu strukturieren, zu vereinfachen und zu veranschaulichen. Dies wird durch die Konvertierung in einen neuen Satz von Variablen erreicht, die Hauptkomponenten, die unkorreliert sind, und die so geordnet werden, dass die erste Komponente diejenige ist mit den größten

Varianzen. Das heißt, sie ordnet die Datensätze in einem multidimensionalen Raum an, so dass die erste Dimension die größten Varianzen innerhalb des Datensatzes repräsentiert, wobei die Varianz-Dimensionen höherer Ordnung abnimmt. Die Zerlegung eines Datensatzes in seiner Repräsentation durch Hauptkomponenten ist eine reproduzierbare und reversibel durchführbare Datentransformation.

Eine PCA kann mittels der *open source*-Programme eSOMet (Haddad et al., 2009), MD (Hiller et al., 2009) und TIGR MeV (Eisen et al., 1998) generiert werden.

2.8.6 Hierarchische Cluster Analyse (HCA)

Hierarchische Cluster Analyse ist eine statistische Methode, die der Mustererkennung von z.B. Proben und Beobachtungen dient, die sich ähnlich verhalten oder die ähnliche Charaktere zeigen und diese dann getrennt von unähnlichen zusammenfasst. Ziel ist es, eine Klassifizierung von Daten unbekannter Struktur in aussagekräftige Gruppen zu erstellen. Unter agglomerativem hierarchischen Clustern, welches hier in der Arbeit Anwendung findet, versteht man das schrittweise Zusammenfassen von Clustern nach einem bestimmten Kriterium ausgehend von der Anfangssituation, in welcher jede Probe oder Beobachtung ein eigenes Cluster bildet. Zu den agglomerativen Clusterverfahren zählen Single Linkage, Complete Linkage, Average Linkage, Centroid, Median, Ward. Die Ähnlichkeit von Proben kann mit Hilfe der Euklidischen Distanz ermittelt werden, wobei am Ende der Analyse ein Dendrogramm, das einer Baumstruktur ähnelt, erstellt wird. Eine HCA wird mit den Programmen eSOMet (Haddad, et al., 2009) sowie TIGR MeV (Eisen et al., 1989; Raychaudhuri et al., 2000) erzeugt und in dieser Arbeit angewendet.

2.8.7 T-Test-Analyse

Ein weiteres statistisches Hilfsmittel ist die paarweise T-Test-Analyse, die sich der t-Verteilung (*t-distribution*) sowie des arithmetischen Mittels bedient. Er liefert eine Entscheidungshilfe, ob ein ermittelter Mittelwertsunterschied zufällig entstanden ist oder reelle bedeutsame Unterschiede zwischen den zu analysierenden Gruppen bestehen. Vereinfacht: ob untersuchte Gruppen in ihrem arithmetischen Mittel systematisch variieren oder nicht. Die Nullhypothese besagt, dass die Mittelwertdifferenz zufällig resultiert.

In einer T-Test-Analyse werden relative Änderungen der Metabolitkonzentrationen nach vorangegangener Transformation, mit dem bereits in TIGR MeV implementierten Algorithmus, mit Hilfe eines Farbschematas, in dieser Arbeit eine Rot-/Grün-Darstellung, abgebildet. Anwendung fand der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen, der für kleine

Probengruppen mit ungleichen Varianzen bestimmt ist (Welch, 1947). Die relevante Signifikanz ist den entsprechenden Abbildungen der T-Test-Analyse zu entnehmen.

2.8.8 Ergänzende Tools

Eine weitere Visualisierungsmethode der Daten ist die Darstellung der relativen, semi-quantitativen Metabolitkonzentrationen anhand von Streudiagrammen („Scatter Plots“). Diese wurden mittels der Programme Scatter Plot beta 7, das in unserer Arbeitsgruppe in Braunschweig von Timo Lühr entwickelt wurde, und Origin5.0 (Microcal Software) erstellt. Dafür wurden die Daten vor Erstellung der Plots logarithmiert und transformiert, um anschließend verschiedene Experimente miteinander vergleichen zu können.

Zusätzlich wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt, der in CUMETA (Cologne University BioInformatics Center) implementiert ist und wie folgt kalkuliert wird:

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x \cdot s_y}$$

mit

$$s_{xy} = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad s_y = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

Der Korrelationskoeffizient wird als ein Maß für die Ähnlichkeit der Experimente angesehen; je höher der Korrelationskoeffizient, desto größer die Ähnlichkeit. Die erhaltenen Werte liegen zwischen -1 (Divergenz) und +1 (Konvergenz). Beträgt er +1, sind die Experimente vollständig positiv miteinander korreliert, und die Messpunkte liegen bei einer zweidimensionalen Darstellung im Streudiagramm auf einer Ursprungsgeraden mit der Steigung +1. Es verhält sich genau umgekehrt bei einem Korrelationskoeffizienten von -1. Ein Wert um 0 bedeutet, dass keine Beziehung der Experimente zueinander vorliegt.

2.9 Transkriptomanalyse

Die in der Arbeit verwendeten Transkriptomdaten wurden im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Medizinischen Hochschule Hannover, MHH, (Abteilung Herr Prof. Burkhard Tümmler; Arbeitsgruppe Herr Dr. Lutz Wiehlmann) durchgeführt und an uns weitergeleitet.

2.9.1 Herstellung der RNA und cDNA

Die für die Gewinnung der RNA und cDNA verwendeten Proben wurden nach dem Protokoll in Kapitel 2.4.4. in der MHH hergestellt. Für die Anzucht der Kulturen wurde je ein Minimalmedium (vgl. Kap. 2.2.2) mit Succinat und mit Cadaverin als alleiniger Kohlenstoffquelle verwendet. Geerntet wurden die Proben zwei Stunden nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, was dem Zeitpunkt der Ernte der Proben für die Metabolomanalyse entsprach.

Für die Transkriptomanalyse wurden aus drei separaten Kultivierungen je 4 ml Kultur für die RNA-Extraktion entnommen, die mit den RNAprotect® Reagent und Rneasy® Kit der Firma Qiagen aufgereinigt wurde. Die drei Replikate wurden für die Herstellung der cDNA zu gleichen Teilen gemischt. Die cDNA wurde nach dem Affymetrix GeneChip®-Protokoll hergestellt und anschließend auf die zwei Affymetrix GeneChip® -Replikate aufgeteilt. Die Hybridisierung und Auslesung der Affymetrix GeneChips® erfolgte durch die Affymetrix Core Facility am HZI.

2.9.2 Microarray Daten Analyse

Die aus dem Affymetrix GeneArray Scanner resultierenden Rohdaten wurden mittels der *Bioconductor Software Framework* (Gentleman et al., 2004) präprozessiert. Die Expressionswerte wurden unter Anwendung der *Robust Multichip Average* (RMA) Methode (Irizarry et al., 2003 a, b), der quantilen Normalisierung (Bolstad et al., 2003), der *Background corrected PM intensities* sowie dem *Median Polish* als Summierungsmethode kalkuliert. Die Präprozessierung wurde in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Maurice Scheer übernommen.

3 Ergebnisse & Diskussion

Der Ergebnis- und Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit ist in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt werden die Ergebnisse zu *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 präsentiert und diskutiert. Zunächst wurden die Wachstums- und Kultivierungsbedingungen für verschiedene Kohlenstoffquellen in einem 5 L Fermenter mit 3 L Kulturmedium etabliert, bevor mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie aufgenommene metabolische Profile unter verschiedenen Bedingungen verglichen wurden.

Im zweiten Abschnitt werden die Analysen von *Pseudomonas aeruginosa* vorgestellt, beginnend mit dem Vergleich von Profilen intrazellulärer Metabolitkonzentrationen unterschiedlicher *P. aeruginosa* Referenzstämmen unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen.

Im Anschluss daran wurde eingangs das Wachstumsverhalten von drei sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolaten von jeweils zwei klinischen Cystische Fibrose-Patienten analysiert, bevor der Einfluss der zeitlichen Adaptation der *P. aeruginosa* CF-Isolate an die CF-Lunge anhand der metabolischen Profile charakterisiert wurde.

Ferner wurden die Profile intrazellulärer Metabolitkonzentrationen von fünf Transposonmutanten auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen mit dem entsprechenden Referenzstamm verglichen. Dabei standen für zwei der fünf Kultivierungsbedingungen zusätzlich Transkriptomdaten zur Verfügung.

Abschließend wurde die Extraktionsmethode für hydrophobe Metabolite für *P. aeruginosa* etabliert und an dem Referenzstamm TBCF10839 sowie an einer Transposonmutante angewendet.

3.1 *Corynebacterium glutamicum*

Für die Kultivierung von *C. glutamicum* in einem 5 L Fermenter auf Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle wurden die optimalen Wachstumsbedingungen im Fermenter mit 3 L Medium bereits in (meiner) Diplomarbeit (Frimmersdorf, 2005) etabliert. Diese Glucose-Kultivierung im Fermenter wurde im Zuge dieser Doktorarbeit reproduziert und dient im Verlaufe dieses Abschnittes als Referenz. Die Kultivierungsbedingungen bei Wachstum auf Quinat als Kohlenstoffquelle mussten für eine 3 L Fermentation in einem 5 L Fermenter adaptiert und etabliert werden.

Ausgangspunkt für die Kultivierung von *C. glutamicum* auf Quinat war die Diplomarbeit von Choorapoikayil (2006), in der Shikimat-Dehydrogenase *knock-out*-Mutanten aus *C. glutamicum* metabolomisch analysiert wurden. Im Zuge der Diplomarbeit wurden die Wachstumsbedingungen auf Quinat für Schikanekolben getestet, allerdings weder optimiert noch reproduziert. Daher mussten sie für die Kultivierung im Fermenter noch adaptiert werden, um anschließend die metabolischen Profile von *C. glutamicum* bei Wachstum auf Quinat mit denen von Glucose vergleichen zu können. Interessanterweise konnte eine auftretende rötlich-violette Verfärbung des Quinat-Mediums zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach 3 - 4 Stunden während der Kultivierung von *C. glutamicum* in Schikanekolben detektiert werden. Dies sollte anhand von Fermentationen im größeren Maßstab reproduziert und metabolomisch analysiert werden.

3.1.1 Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Der Einfluss der Kohlenstoffquelle sowie die das Bakterium umgebenden Konditionen (Schikanekolben, Fermenter) sind entscheidende Faktoren für sein Wachstumsverhalten. Deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten können anhand der in Abbildung 19 gezeigten Wachstumskurven sowohl auf Glucose als auch auf Quinat während einer Kultivierung im Schikanekolben (A) und im Fermenter (B) aufgezeigt werden (vgl. Kap. 2.4.3.2 – 2.4.3.5).

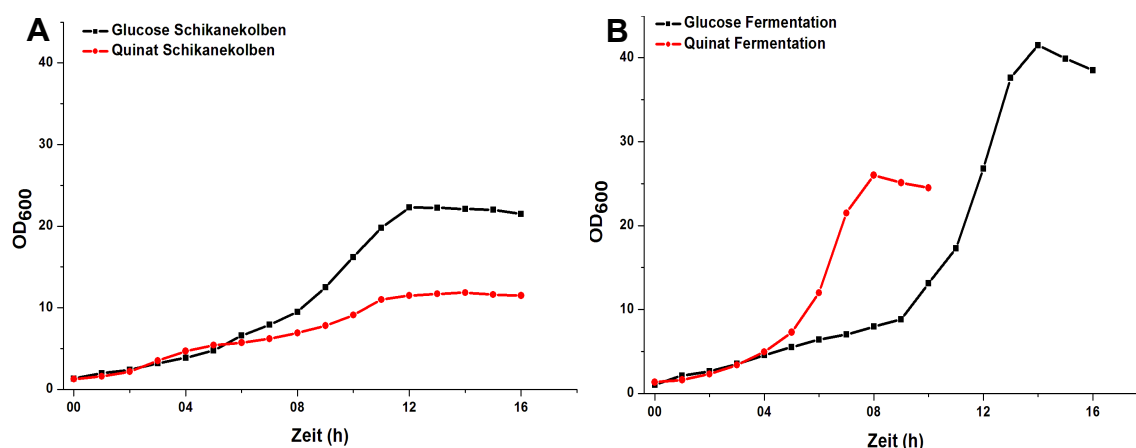


Abb. 19. Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* während der Kultivierung im Schikanekolben (A) sowie im Fermenter (B).

In der lag-Wachstumsphase zeigen beide Kultivierungsvarianten sowohl auf Glucose als auch auf Quinat einen synchronen Verlauf. Allerdings divergieren die Kulturen nach 5 Stunden in Schikanekolben sowie nach 4 Stunden im Fermenter voneinander.

In den Schikanekolben treten die Zellen der Glucose-Kultivierung nach ungefähr 5 Stunden in die exponentielle, nach 12 Stunden in die stationäre Wachstumsphase ein und erreichen eine optische Dichte (OD) von etwa 22. Dahingegen kann eine klare Einteilung zwischen den verschiedenen Wachstumsphasen innerhalb der Quinat-Kultivierung nicht erfolgen. Die Zellen erzielen nach 14 Stunden lediglich eine OD von etwa 12. Die spezifische Wachstumsrate (vgl. Kap. 2.4.2 [1]) der Glucose-Kultivierung beträgt 0.26h^{-1} und die Verdopplungszeit (vgl. Kap. 2.4.2 [2]) der Biomasse 2.67h. Die spezifische Wachstumsrate der Quinat-Kultivierung weist einen Wert von 0.19h^{-1} und eine Verdopplungszeit der Biomasse von 3.65h auf. Die charakteristische Farbe einer auf Glucose inkubierten Kultur ist milchig-gelb. Die auf Quinat inkubierte Kultur ist anfänglich noch milchig-gelb, weist 4 Stunden nach Beginn der Kultivierung allerdings eine rötlich-violette Färbung auf.

Ein konträres Bild des Wachstumsverhaltens spiegeln die Kulturen innerhalb der Fermentationen (B) wider. Zunächst kann für beide Kultivierungen eine Einteilung in einzelne Wachstumsphasen vorgenommen werden. Die Zellen der Quinat-Kultivierung treten bereits nach 4 Stunden in die exponentielle, nach 8 Stunden in die stationäre Wachstumsphase ein und erreichen eine maximale OD von 26. Der Eintritt der Zellen der Glucose-Kultivierung in die exponentielle Wachstumsphase erfolgt nach 9 und in die stationäre nach 14 Stunden. Die maximal OD beträgt nach 14 Stunden 42.

Die spezifische Wachstumsrate der Glucose-Kultivierung beträgt 0.47h^{-1} und die Verdopplungszeit der Biomasse 1.47h . Dahingegen weist die Quinat-Kultivierung eine höhere spezifische Wachstumsrate von 0.54h^{-1} und eine Verdopplungszeit von 1.28h auf.

Das Medium sowohl in der Glucose- als auch in der Quinat-Fermentation behält über den gesamten Fermentationszeitraum die charakteristische milchig-trübe Färbung von *C. glutamicum*-Kulturen.

Die Zellen der Quinat-Kultivierung im Fermenter zeigen ein konträres Wachstumsverhalten zu denen in Schikanekolben auf. Die spezifische Wachstumsrate der im Fermenter auf Quinat gewachsenen Zellen ist signifikant höher als die in Schikanekolben auf Quinat gewachsenen Zellen. Zudem ist die spezifische Wachstumsrate der Quinat-Kultivierung im Fermenter höher als die der Glucose-Kultivierung im Fermenter.

Dahingegen weisen die Zellen der Glucose-Kultivierung ein vergleichbares Wachstumsverhalten innerhalb der Schikanekolben sowie dem Fermenter auf.

Der zu beobachtende Unterschied in dem Wachstumsverhalten der Quinat-Kultur im Fermenter, verglichen mit denen im Schikanekolben, könnte mit den kontrollierten Bedingungen im Fermenter begründet werden.

Die Kultivierung im Fermenter wird im Gegensatz zu der im Schikanekolben unter stringenter Kontrolle, wie die Darstellungen der Fermentationsparameter in Abbildung 20 zeigen, realisiert und im Folgenden detaillierter beschrieben.

Zu den Parametern, die sich während einer Fermentation ändern können, gehören die Geschwindigkeit des Rührers, die Pumpleistungen der Säure und Base, das Wachstumsverhalten des entsprechenden Organismus sowie der pH-Wert, sofern er nicht von vornherein in bestimmten Grenzbereichen eingehalten wird. Die Temperatur sowie der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) sollten nicht von ihren festgelegten Werten abweichen. Einzelne Werte der Fermentationsparameter sind der Tabelle 14 im Kapitel 2.4.3.5 zu entnehmen.

Anhand Abbildung 20 kann die Aussage getroffen werden, dass sich die Fermentationsparameter (Rührergeschwindigkeit, Pumpleistungen der Säure und Base) an dem Wachstumsverhalten der Kultur orientieren. Allerdings variieren diese Parameter zwischen der Quinat-Kultivierung (B) und der Glucose-Kultivierung (A).

Während der Glucose-Kultivierung (A) wird innerhalb der lag- sowie stationären Wachstumsphase Säure zugeführt, wohingegen in der Quinat-Kultivierung (B) während der gesamten Kultivierung Säure eingeleitet werden muss, um den pH-Wert stabil zu halten. Die Zufuhr der Base erfolgt in A innerhalb des exponentiellen und in B zu Beginn des stationären Wachstums.

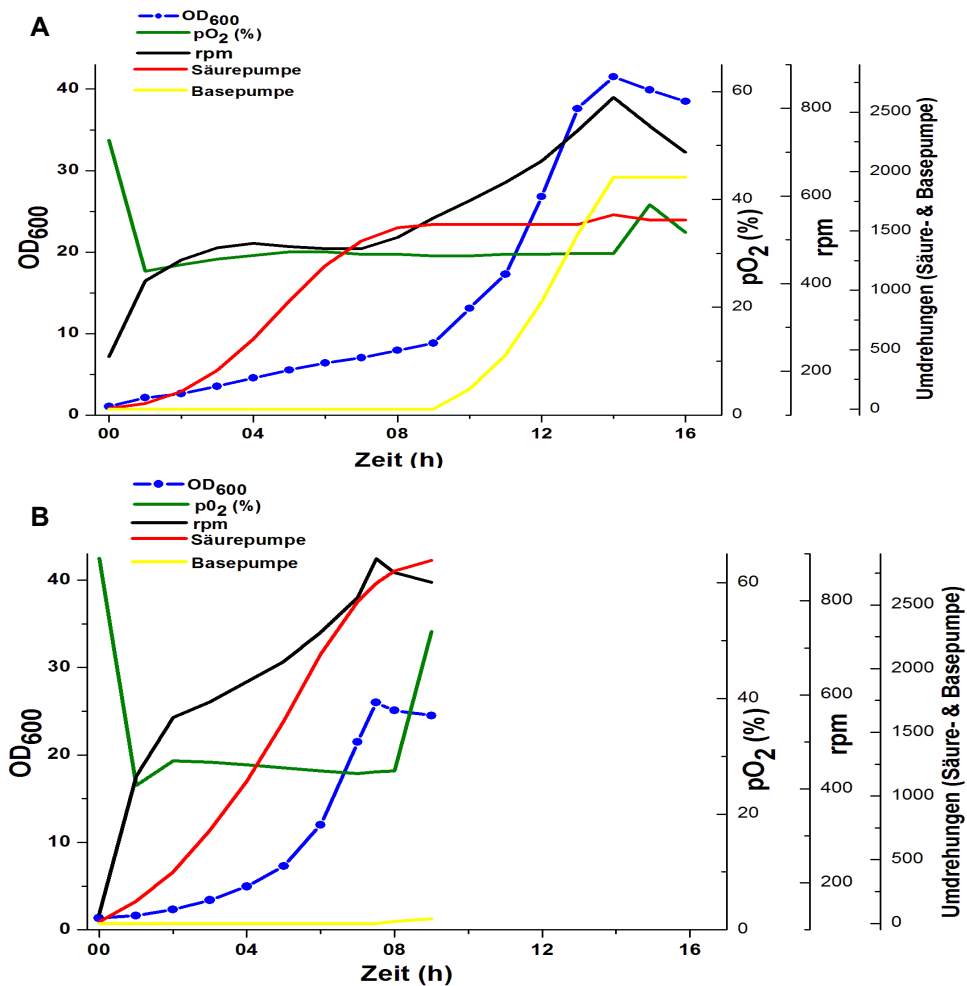


Abb. 20. Fermentationsparameter bei der Kultivierung mit Glucose (A) und Quinat (B) von *C. glutamicum*.

Des weiteren weist der pO₂-Gehalt Unterschiede zwischen der Glucose- (A) sowie der Quinat-Kultivierung (B) auf. In A ist der pO₂-Gehalt von 30% über den gesamten Fermentationszeitraum unverändert, ausgenommen der ersten Stunde aufgrund der vor Beginn der Kultivierung erfolgten Kalibrierung der Sauerstoffsonde sowie den Eintritt in die stationäre Wachstumsphase in der letzten Stunde der Fermentation.

In der Quinat-Kultivierung hingegen kann der pO₂-Gehalt des Mediums nicht kontinuierlich bei 30% gehalten werden. Es erfolgt bereits 2 Stunden nach Animpfen des Fermenters ein stetiger Abfall des pO₂-Gehalts. Der Rührer kann diesen Abfall nicht kompensieren, so dass zusätzlich Druckluft in das Medium eingebracht werden muss, erkennbar an der leichten Reduktion der Rührergeschwindigkeit (2. - 5. Stunde).

Dieses Verhalten spiegelt einen signifikant erhöhten Sauerstoffbedarf der auf Quinat wachsenden Kultur, möglicherweise aufgrund des gestiegenen Energiebedarfs infolge des schnellen Wachstums, wider.

In den Abbildungen 19 und 20 kann gezeigt werden, dass die Quinat-Kultur infolge der Kontrolle der Fermentationsparameter ein signifikant verändertes Wachstumsverhalten zu den unkontrollierten Bedingungen in den Schikanekolben aufweist. Dies deutet auf die Notwendigkeit der Kontrolle der Quinat-Kultur hin.

Anhand der beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* ATCC 13032 in der Lage ist, sowohl Glucose als auch Quinat als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Glucose wird über das Glucose-Phosphotransferase-System (PTS) über die Membran in die Zelle als Glucose 6-Phosphat eingespeist, mittels der Glucose-6-Phosphat-Isomerase [EC 5.3.1.9] zu Fructose 6-Phosphat umgesetzt und weiter über die Glycolyse (vgl. Kap. 1.5) und den Zitronensäurezyklus metabolisiert. Dadurch ist *C. glutamicum* in der Lage, direkt Energie für beispielsweise die Aminosäure- und die Proteinbiosynthese sowie die Synthese von Zellwandbestandteilen zu generieren.

Für Quinat hingegen existiert bislang noch kein annotierter Transporter in *C. glutamicum* ATCC 13032. Ebenso ist das Enzym für den ersten Reaktionsschritt von Quinat zu 3-Dehydroquinat (Abb.21) für *C. glutamicum* laut KEGG bislang noch nicht annotiert worden. In der Dissertation von Schoepe (2006) wurde eine NAD-abhängige Quinat/Shikimat-Dehydrogenase [EC 1.1.1.24] (Abb. 21) aus *C. glutamicum* 13032 isoliert, die in der Lage ist, sowohl Quinat als auch Shikimat umzusetzen. Während der Kultivierung von *C. glutamicum* auf Quinat konnte ein signifikantes Wachstum festgestellt werden, was auf die Existenz eines Transporters für Quinat in *C. glutamicum* ATCC 13032 analog zum Bakterium *Gluconobacter* (Adachi et al., 2003) hindeutet. Ungeklärt ist jedoch, ob dieser spezifisch oder unspezifisch für den Quinat-Transport in die Zelle ist.

Der postulierte Abbauweg von Quinat (Shen et al., 2005 a,b), der in der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan- sowie Shikimat-Biosynthese eingebunden ist, wird in Abbildung 21 dargestellt. Die für die Enzyme in Klammern angegebene Relevanz der Datenbankeinträge ist die Summe aller mittels *EnzymeDetector* zugewiesenen Werte für eine Gen/Enzym-Kombination. Dieser Wert wird dann vergeben, wenn die Input-Datenbank dieses Enzym annotiert hat, das Evaluationsprogramm diese Annotation vorschlägt oder das Enzym, basierend auf BRENDA/AMENDA (Schomburg et al., 2002), existiert. Die Summe aller Werte (Relevanz) reflektiert die Qualität der Annotation.

Ein möglicher Abbauweg wurde von Shen et al. (2005 a, b) mit Hilfe von Sequenzanalogien abgeleitet. Dabei wird Quinat über drei enzymatische Reaktionen

(Abb. 21), katalysiert durch die Quinat-Dehydrogenase, die 3-Dehydroquinat-Dehydratase und die Quinat/Shikimat-Dehydrogenase, zu 3,4-Dihydroxybenzoat (Protokatechuat) konvertiert. Anschließend wird 3,4-Dihydroxybenzoat über den β -Ketoadipatweg metabolisiert. Daraus resultieren Acetyl-CoA sowie Succinyl-CoA, die im Zitronensäurezyklus eingespeist werden können.

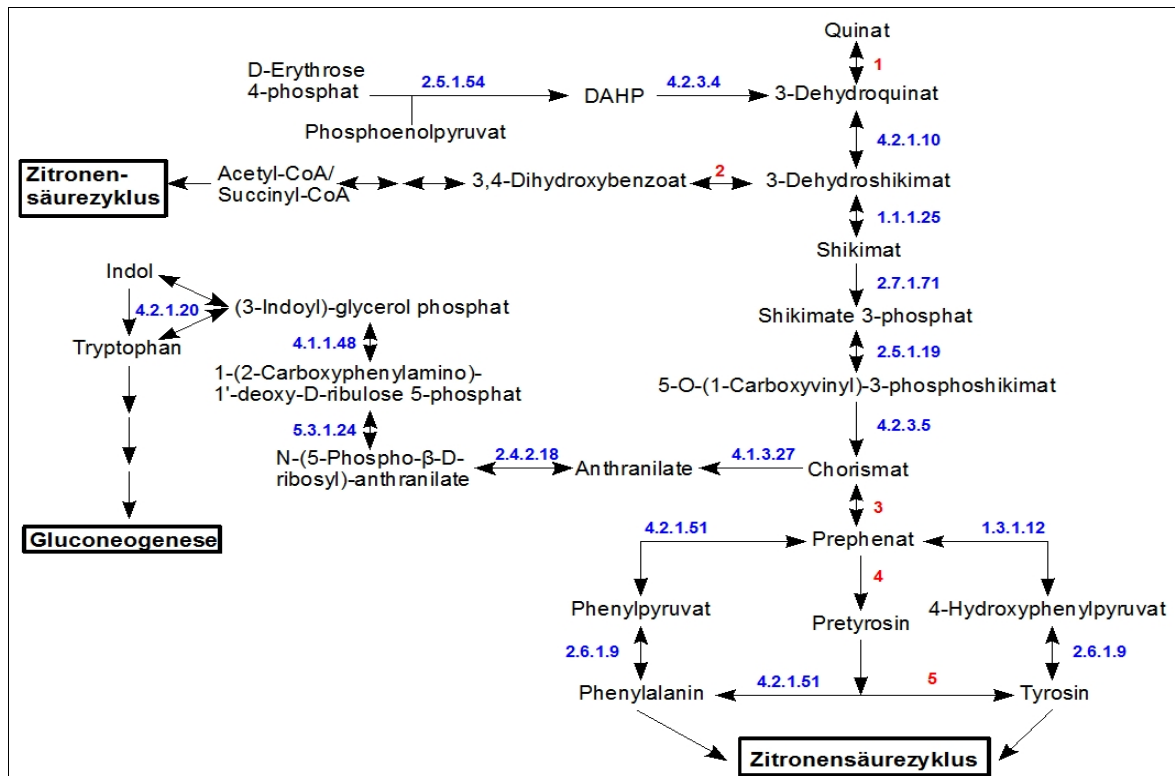


Abb. 21. Schematische Darstellung der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan- sowie der Shikimat-Biosynthese. Blaue Enzymnamen stellen in KEGG für *C. glutamicum* ATCC 13032 annotierte Enzyme dar. In runden Klammern wird die Relevanz der Datenbankeinträge (vgl. Kap. 2.7.1.2.) angegeben: [EC 2.5.1.54] 3-Deoxy-7-Phosphoheptulonat Synthase (Relevanz 0); [EC 4.2.3.4] 3-Dehydroquinat Synthase (Relevanz 5); [EC 4.2.1.10] 3-Dehydroquinatdratase (Relevanz 5); [EC 1.1.1.25] Quinat/Shikimat-Dehydrogenase (Relevanz 7); [EC 2.7.1.71] Shikimat Kinase (Relevanz 4); [EC 2.5.1.19] 3-Phosphoshikimat 1-Carboxyvinyltransferase (Relevanz 4); [EC 4.2.3.5] 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-Phosphoshikimat Phosphatlyase (Relevanz 4); [EC 4.1.3.27] Chorismat Pyruvatlyase (Relevanz 5); [EC 2.4.2.18] Anthranilat Phosphoribosyltransferase (Relevanz 7); [EC 5.3.1.24] & [EC 4.1.1.48] Bifunktionale Indol-3-Glycerol Phosphat Synthase (Relevanz 4); [EC 4.2.1.20] Tryptophan Synthase Subunit beta (Relevanz 5); [EC 4.2.1.51] Prephenat Dehydrogenase (Relevanz 7); [EC 1.3.1.12] Prephenat Dehydrogenase (Relevanz 7); [EC 2.6.1.9] Histidinol-Phosphat Aminotransferase (Relevanz 7). Die roten Zahlen zeigen die in KEGG für *C. glutamicum* ATCC 13032 noch nicht annotierten Enzyme an: 1. [EC 1.1.1.24] Quinat-Dehydrogenase (Relevanz 0); 2. [EC 4.2.1.-] 3-Dehydroshikimat Hydrolyase QuiC; 3. [EC 5.4.99.5] Chorismat Pyruvatmutase (Relevanz 5); 4. [EC 2.6.1.57] Aromatische Aminosäure Transaminase; 5. [EC 1.3.1.43] Argonat Dehydrogenase (Relevanz 0).

Dehydroquinat und Dehydroshikimat, Intermediate der Shikimat-Biosynthese, führen zu verzweigten Biosynthesewegen aromatischer Aminosäuren, Vitaminen und Quinonen. Zudem können Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat, Intermediate der Glycolyse und des Pentosephosphatwegs, zu Chorismat konvertiert werden. Chorismat wiederum stellt die Vorstufe der Biosynthese aromatischer Aminosäuren (Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin) dar (Teramoto et al., 2009). Diese Aromaten sind gemischt ketogen-glucogen und können als glucogene Aminosäuren via Fumarat in die Gluconeogenese bzw. als ketogene Aminosäuren via Pyruvat in die Fettsäuresynthese einfließen (Müller-Esterl, 2009).

Für *P. putida* wurde in einer Studie von Nogales et al. (2008) mit Hilfe einer *genome-scale metabolic reconstruction* (Genomweite metabolische Rekonstruktion) der Katabolismus von Phenylalanin via Tyrosin und Homogentisat zu Fumarat bereits beschrieben. Für *C. glutamicum* konnte zunächst anhand von Enzymassays mit aufgereinigten Proteinen die Umsetzung von Gentisat zu Fumarat, jedoch nicht der von Homogentisat zu Gentisat sowie von Phenylalanin zu Tyrosin, nachgewiesen werden (Shen et al., 2005).

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Teramoto et al. (2009) wurde gezeigt, dass *C. glutamicum* sowohl auf Quinat als auch auf Shikimat als alleinige Kohlenstoffquelle wachsen kann. Auf dem Chromosom von *C. glutamicum* R (Yukawa et al., 2007) ist ein Gencluster *qsuABCD* lokalisiert, das vermutlich an den Reaktionen des Quinat/Shikimat-Metabolismus, um Protocatechuat zu generieren, beteiligt ist. Das Gen *qsuA* von *C. glutamicum* R kodiert ein Protein, das eine 40% Aminosäure-Sequenzidentität zu einem *E. coli* Shikimat-Transporter (Whipp et al., 1998), der zu der *major facilitator superfamily* gehört, aufweist. Laut der CoryneRegNet Datenbank (Baumbach et al., 2009) (www.coryneregnet.de) kodiert das Gen *qsuA* in *C. glutamicum* ATCC 13032 für ein putatives Integral-Membran-Transport-Protein (Stand 22.11.2009), das möglicherweise einen unspezifischen Quinat/Shikimat-Transporter darstellen könnte.

C. glutamicum R kann infolge der Expression der *qsuABCD* Gene die hydroaromatischen Komponenten, Quinat und Shikimat, effizient metabolisieren (Teramoto et al., 2009).

3.1.2 Grundlegende Beschreibung der Metabolomanalysen der Quinat- und Glucose-Fermentation

Während der Glucose- sowie Quinat-Kultivierungen in einem 5 L Fermenter mit 3 L Medium wurden stündlich Proben entlang der Wachstumskurven in einer Dreifachbestimmung geerntet, aufgearbeitet, mittels des GC-Quadrupol-MS vermessen und anschließend ausgewertet (vgl. Material & Methoden). Die dabei detektierten Targets, aufgeteilt in bekannte Metabolite und Anzahl der nicht identifizierten Verbindungen, deren relative Gesamtfehler sowie die gemeinsamen Targets, sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tab. 16. Tabellarische Übersicht über durchgeführte Fermentationen

	Relative Gesamtfehler	Detektierte Targets	Identifizierte Metabolite	Nicht identifizierte Verbindungen	Gemeinsame Targets Glucose – Quinat
Glucose	16.4%	183	115	67	140
Quinat	17.9%	180	119	60	

Der relative Gesamtfehler jeder Fermentation stellt den mittleren prozentualen Standardfehler aller mittleren Konzentrationen ($n = 3$ Replikate) aller gemessener Targets über alle Entnahmezeitpunkte dar und bezeichnet die Reproduzierbarkeit der angewendeten Methode, begonnen mit der Ernte der Zellen. Der relative Gesamtfehler der Quinat-Fermentation weicht lediglich um 1.5 % von dem der Glucose-Fermentation ab und liegt bei 17.9%.

Die detektierten Targets werden in zwei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe sind die bereits identifizierten Metabolite und in der anderen Gruppe die zwar detektierten, aber unbekannten Verbindungen, bei denen noch keine oder keine endgültige Identifizierung stattgefunden hat, aufgelistet. Die Anzahl identifizierter Verbindungen wird ohne internen Standard (Ribitol) und den Alkanmix angegeben.

Über den gesamten Verlauf der Glucose-Kultivierung konnten 183 Targets (Tab. 16) detektiert werden, davon stellten 67 nicht identifizierte Verbindungen dar. Von den 183 detektierten Targets wurde 1 nur in der lag-, 1 nur in der lag- sowie exponentiellen und 1 nur in der exponentiellen- sowie stationären Wachstumsphase nachgewiesen. Dabei handelt es sich jeweils um eine unbekannte Substanz, auf die nicht näher eingegangen wird.

Über den gesamten Verlauf der Quinat-Kultivierung konnten 180 Targets (Tab. 16) detektiert werden, davon stellten 60 nicht identifizierte Verbindungen dar. Von den 180 detektierten Targets wurden 9 nur in der lag- und 24 nur in der lag- sowie exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen.

Des weiteren konnten 140 gemeinsame Targets, die sowohl in der Glucose- als auch in der Quinat-Fermentation vorliegen, nachgewiesen werden, davon 97 identifizierte und 43 unbekannte Verbindungen. Darüber hinaus zeigte dieser Vergleich 43 Verbindungen, die nur in der Glucose- und 40, die nur in der Quinat-Fermentation detektiert werden konnten.

Zunächst werden die Ergebnisse der Glucose- und Quinat-Fermentation anhand einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) und Hierarchischen Clusteranalyse (HCA) (vgl. Kap. 2.8.5-2.8.6) einzeln dargestellt und beschrieben. Sie dienen der übersichtlichen und kompakten Visualisierung der umfangreich erhobenen Metabolomdaten einer Kultivierung.

Innerhalb einer PCA repräsentiert jeder Punkt eine entlang der Wachstumskurve entnommene Probe. Zusätzlich erfolgt die Angabe einer Gesamtvarianz (1. und 2. Komponente) des Datensatzes, die aus den Hauptkomponenten abgeleitet wird. Dabei stellt die erste die größte Varianz des Datensatzes und nachfolgende sich verringernde Varianzen dar. Vor einer PCA erfolgte die Normierung der Metabolitdaten jeder Probe, um eine Normalverteilung nach Gauß zu erzielen.

In einer HCA werden die Proben in einem Dendrogramm abgebildet. Dabei stellt die Länge der horizontalen und vertikalen Geraden die Distanz zwischen den einzelnen Proben dar. Die farbigen Balken sowie fliederfarbenen Dreikante symbolisieren unterschiedliche Cluster.

3.1.2.1 Glucose-Fermentation

Abbildung 22 visualisiert die stündlich entlang der Wachstumskurve dem Fermenter entnommenen Proben aus einer Glucose-Kultivierung anhand einer PCA mit einer Gesamtvarianz von 40%.

Deutlich ist in Abbildung 22 eine Gruppierung der Proben in vier Cluster zu erkennen, die sich aus den Proben 1-12 (grün), Proben 13-24 (rot), 25-33 (blau) und 34-48 (grau) zusammensetzen. Dabei repräsentieren die Proben 1-12 die lag- Wachstumsphase (grün), die Proben 13-24 (rot) symbolisieren initiales, die Proben 25-33 (blau) verstärktes exponentielles Wachstum, die Proben 34-48 (grau) den Übergang von exponentiellem ins stationäre Wachstum sowie das Erreichen der stationären Wachstumsphase. Anhand der PCA kann bereits eine grobe Einteilung in die Wachstumsphasen vorgenommen werden. Auffallend ist die geringe Distanz zwischen den letzten zwei Clustern, was auf eine Annäherung der metabolischen Profile innerhalb dieser Cluster hinweist.

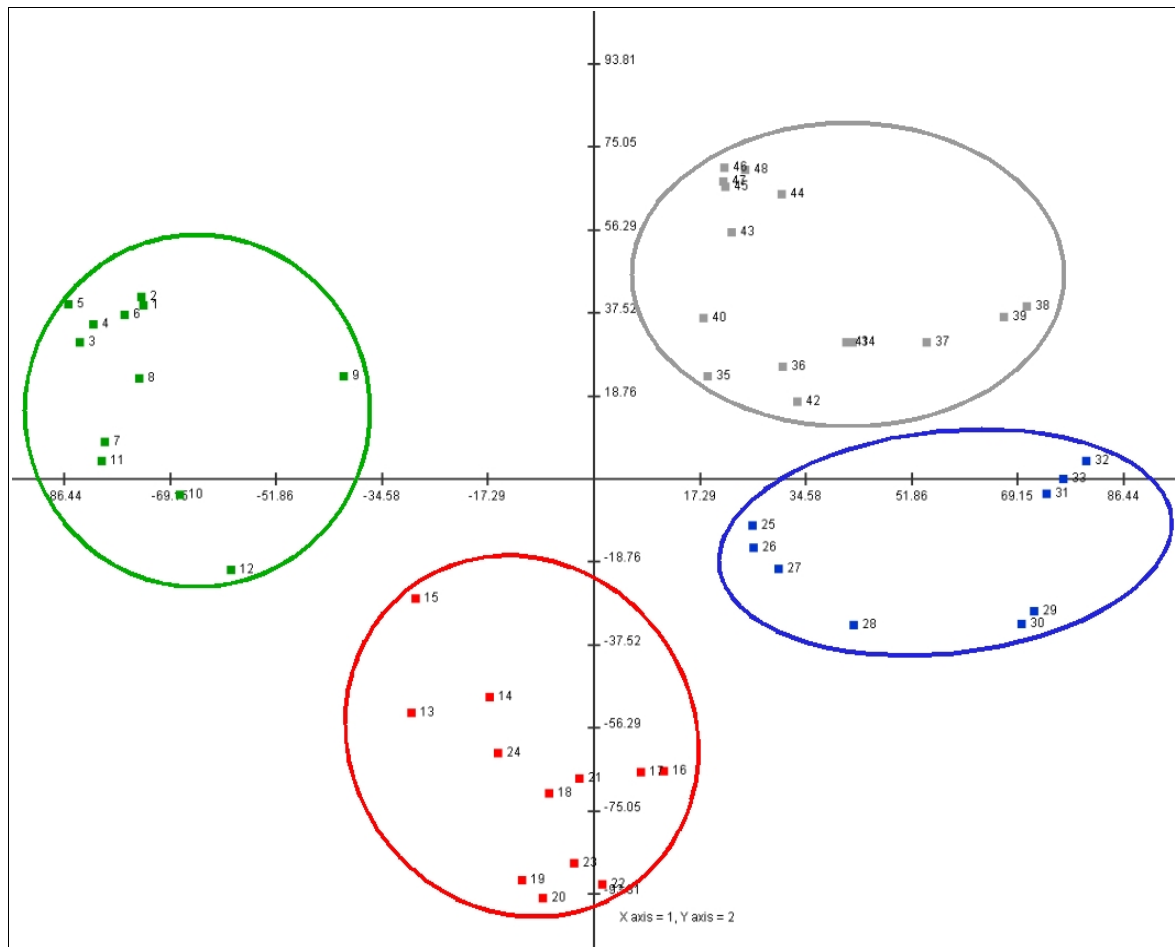


Abb. 22. Darstellung einer PCA einer Glucose-Fermentation. Die Zahlen 1-48 symbolisieren die normierten Metabolitkonzentrationen aller stündlich entlang der Wachstumskurve entnommenen Proben. Die 1. und 2. Komponente der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 40%.

Ein zur PCA analoges Muster der Clusterbildung lässt sich in Abbildung 23, die eine HCA der Glucose-Kultivierung zeigt, erkennen. Dabei wurden die Proben verwendet, die bereits in der PCA (Abb. 22) eingesetzt wurden. In einer HCA clustern die Proben infolge ähnlicher Charaktere, so dass eine Klassifizierung von Daten unbekannter Struktur in aussagekräftige Gruppen resultieren kann. Eine HCA kann folglich zu ähnlichen Ergebnissen wie eine PCA führen.

In der HCA ergeben sich zwei separate Hauptcluster, die durch die Proben 1-24 und 25-48 repräsentiert werden. Die Hauptcluster gliedern sich in jeweils zwei weitere Cluster auf. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (vgl. 2.8.8) für Hauptcluster 1 erzielt einen Wert von 0.961 und für Hauptcluster 2 einen Wert von 0.871. Diese Werte stehen im Widerspruch zu den beschriebenen Beobachtungen in der PCA (Abb. 22), die besagen, dass sich die letzten zwei Cluster annähern.

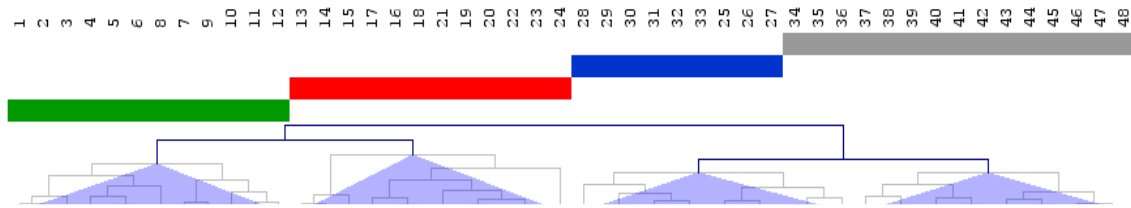


Abb. 23. Darstellung einer HCA einer Glucose-Fermentation. Die Zahlen 1-48 symbolisieren die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung entnommenen Proben. Die Farbgebung entspricht der in Abbildung 22. Hauptcluster 1 (Proben 1-24), Hauptcluster 2 (Proben 25-48).

3.1.2.2 Quinat- Fermentation

Nachfolgend werden die Metabolomdaten der Quinat-Kultivierung anhand einer PCA (Abb. 24) dargestellt. Aufgetragen sind die stündlich entlang der Wachstumskurve dem Fermenter entnommenen Proben aus der Quinat-Kultivierung. Die PCA weist eine Gesamtvarianz von 45% auf.

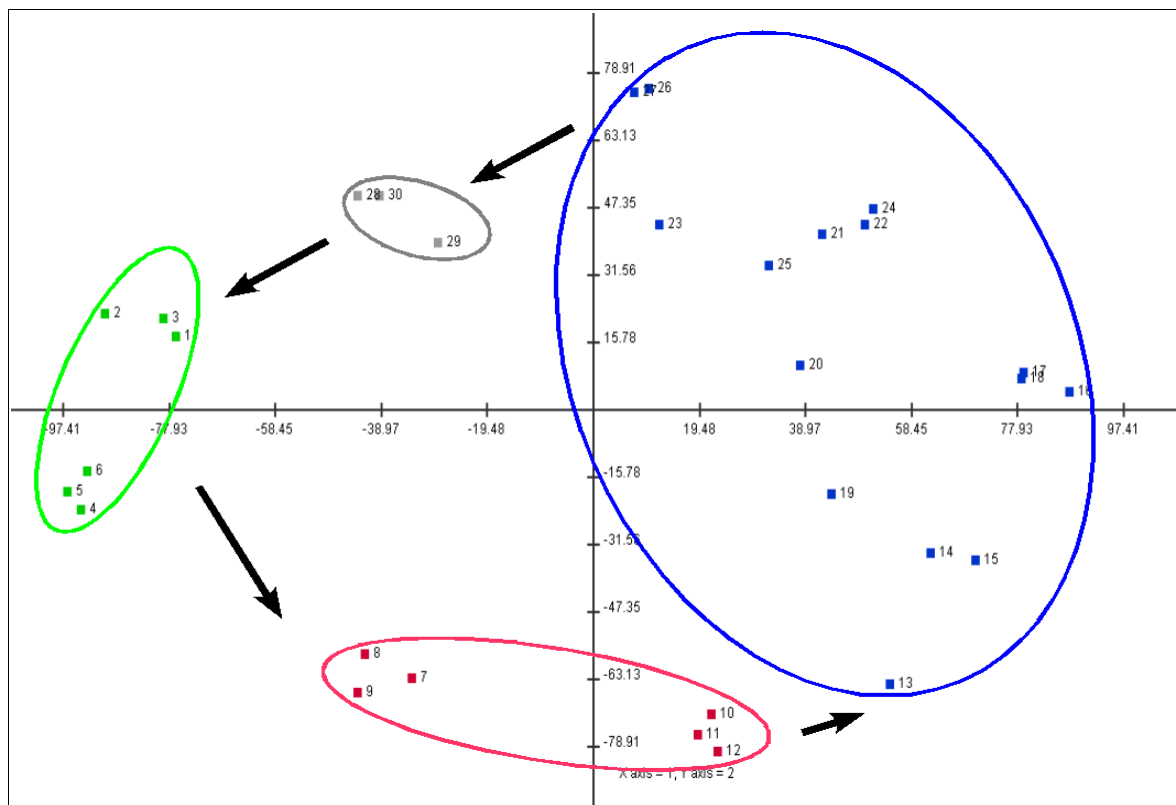


Abb. 24. Darstellung einer PCA einer Quinat-Fermentation. Die Zahlen 1-30 symbolisieren die normierten Metabolitkonzentrationen aller stündlich entlang der Wachstumskurve entnommenen Proben. Die Pfeile deuten eine kreisförmige Anordnung der einzelnen Cluster an. Die 1. und 2. Komponente der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 45%.

Deutlich zu erkennen ist die jeweilige Clusterung der drei Replikate eines jeden Probenentnahmezeitpunktes. Des Weiteren zeigt Abbildung 24 eine Clusterung der einzelnen Wachstumsphasen. Die Proben 1-6 repräsentieren die lag- Wachstumsphase (grün), wobei die Proben 1-3 die Zellen nach Inokulation des Fermenters und die Proben 4-6 die Adaptation der Zellen an das Medium reflektieren. Die Proben 7-12 (rot) symbolisieren initiales, die Proben 13-27 (blau) progressives exponentielles Wachstum. Der letzte Entnahmezeitpunkt (Proben 28-30 (grau)) verdeutlicht das stationäre Wachstum. Auffallend ist die durch Pfeile gekennzeichnete kreisförmige Anordnung der Cluster zueinander.

Ein analoges Muster lässt sich bei der Visualisierung einer HCA (Abb. 25) der Quinat-Kultivierung mit den ebenfalls für die PCA (Abb. 24) verwendeten Proben, detektieren.



Abb. 25. Darstellung einer HCA einer Quinat-Fermentation. Die Zahlen 1-30 symbolisieren die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung entnommenen Proben. Die Farbgebung entspricht der in Abbildung 24. Hauptcluster 1 (Proben 7-27), Hauptcluster 2 (Proben 1-6, 28-30).

Bei der gleichzeitigen Betrachtung der PCA sowie HCA (Abb. 22, 23) zeigt zwei isolierte Hauptcluster, die jeweils in zwei Subcluster divergieren. Das Hauptcluster 1 integriert initiales sowie progressives exponentielles Wachstum, das 2. hingegen die lag- sowie Stationärphase der Zellen. Die Zellen der lag-Wachstumsphase stammen aus einer 15 Stunden im Schikanekolben inkubierten Übernachtskultur (vgl. Kap. 2.4.3.2 – 2.4.3.5), die zu diesem Zeitpunkt den Übergangszustand in die stationäre Wachstumsphase repräsentiert. Infolgedessen resultiert eine hohe Analogie zu den stationär gewachsenen Zellen der Hauptkultur im Fermenter, das mit einem hohen nach Pearson kalkulierten Korrelationskoeffizienten von 0.991 verifiziert werden kann. Die für das Hauptcluster 1 berechnete Korrelation weist einen Wert von 0.994 auf.

Die Anwendung von Korrelationskoeffizienten in der Metabolomanalyse kann Hinweise liefern, inwiefern sich Analogien oder Differenzen in dem metabolischen Verhalten binnen der zu charakterisierenden Spezies/Organismen abzeichnen.

Die hohe Korrelation von Hauptcluster 1, das die Proben des exponentiellen Wachstums umfasst, deutet auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten hin. Die hohe Korrelation von Hauptcluster 2 ist ein Indiz für eine Annäherung des Metabolitpools der stationären an die lag-Wachstumsphase.

Auf diese Art und Weise können mit Hilfe einfacher chemometrischer Analysen, wie der PCA und HCA, ohne detaillierte Betrachtung der Metabolitkonzentrationen, die Charaktere von Daten und ihre Lokalisation zueinander determiniert werden.

3.1.3 Metabolische Profile von *C. glutamicum* bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen im Vergleich

Um im Anschluss an die Charakterisierung der Proben den Einfluss der Wachstumsphasen auf das Metabolom von *C. glutamicum* zu analysieren, werden zunächst relative, semiquantitative Metabolitkonzentrationen aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase der Quinat-Kultivierung miteinander verglichen und in einem Streudiagramm dargestellt. Auf die Analyse der Proben des exponentiellen und stationären Wachstums der Glucose-Fermentation wird nicht näher eingegangen, da diese bereits Grundlage der Diplomarbeit war.

Die in den Streudiagrammen gekennzeichneten Punkte markieren Metabolite, die sich in ihrer Konzentration zwischen den Wachstumsphasen unterscheiden und auf die detaillierter im Text eingegangen wird. Punkte, die sich innerhalb der Streudiagramme auf einer winkelhalbierenden Geraden (vgl. Kap. 2.8.8) befinden, repräsentieren Metabolite mit gleichen Konzentrationen.

Einschränkungen werden hinsichtlich der Angabe von unbekannten Substanzen innerhalb der Streudiagramme getätigt. Unbekannte Substanzen, die als „Unknown“ in unseren Bibliotheken aufgelistet sind, sind strukturell nicht identifizierte Komponenten, die wiederholt in Proben detektiert wurden. Zusätzlich werden, der Übersichtlichkeit halber, nicht alle signifikant veränderten, identifizierten Metabolite namentlich gekennzeichnet.

Die für die Streudiagramme verwendeten Proben bestehen jeweils aus drei Replikaten ($n=3$), deren gemessene Metabolitkonzentrationen gemittelt wurden. Im Weiteren werden lediglich die Proben der exponentiellen und stationären Wachstumsphase näher charakterisiert. Die Kulturen der selektierten Proben der exponentiellen Wachstumsphase der Quinat-Fermentation wiesen zu diesem Entnahmezeitpunkt die höchste spezifische Wachstumsrate und dadurch die niedrigste Verdopplungszeit auf (vgl. Kap. 3.1.1.2).

Abbildung 24 stellt die metabolischen Profile der stationären (Ordinate) und exponentiellen (Abszisse) Wachstumsphase der Quinat-Fermentation im Vergleich dar. Der zwischen diesen Wachstumsphasen kalkulierte Korrelationskoeffizient nach Pearson ergibt einen Wert von 0.983 und zeigt Varianzen im metabolischen Profil beider Wachstumsphasen auf. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen liegt in der exponentiellen Wachstumsphase der Quinat-Fermentation bei 15.5% und in der stationären Wachstumsphase bei 17.2%.

In Tabelle 17 sind die Mittelwerte der semiquantitativen Intensitäten der Replikate aus dem exponentiellen und stationären Wachstum der Quinat-Fermentation zusammengefasst. Durch die Division dieser Werte (Quinat exponentiell/Quinat stationär) resultiert ein Faktor der Metabolite, die in der exponentiellen Wachstumsphase der Quinat-Fermentation hoch- (Faktor > 2) oder herunterreguliert (Faktor < 0.5) vorliegen. Zudem sind alle diskutierten Metabolite und Enzyme in den Stoffwechselkarten im Anhang sowie in Abbildung 21 dargestellt.

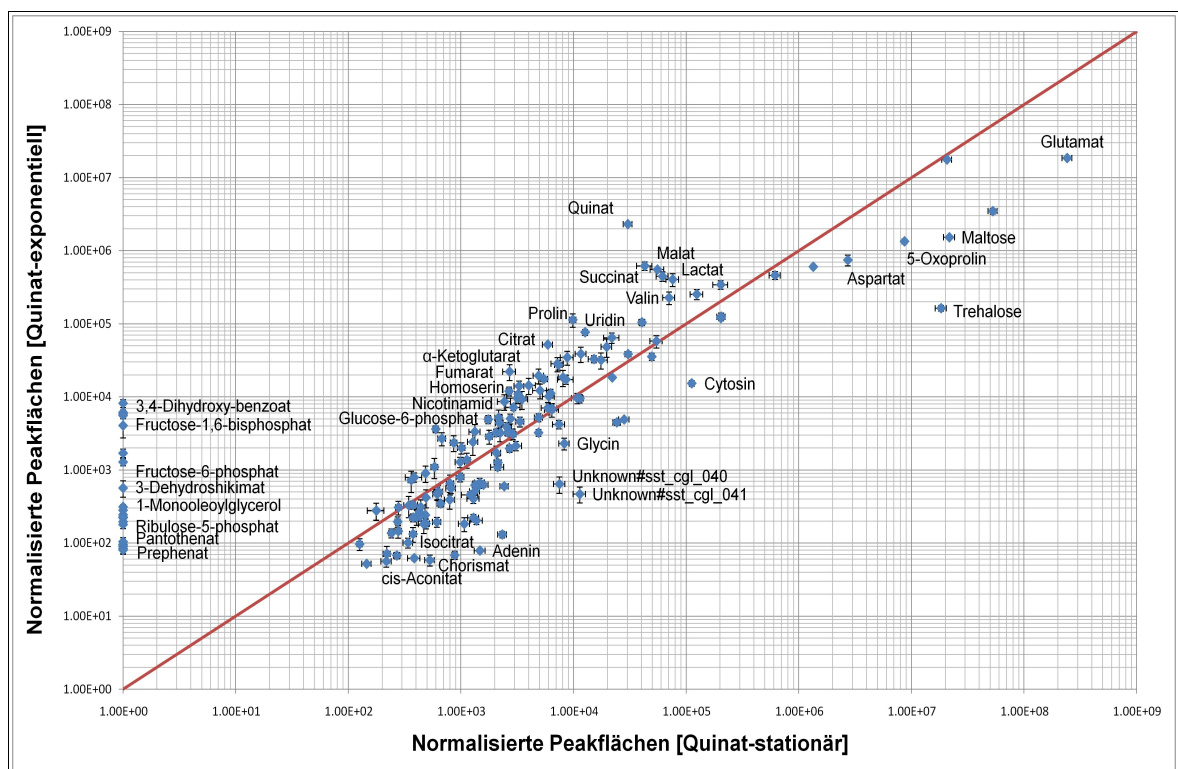


Abb. 26. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich exponentielle gegen stationäre Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >2.

In der exponentiellen, verglichen mit der stationären Wachstumsphase, der Quinat-Fermentation (Tab. 17) akkumulieren Intermediate der oberen Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (Quinat, 3-Dehydroshikimat, 3,4-Dihydroxybenzoat, mit der Ausnahme Prephenat), des Zitronensäurezyklus (Citrat, α -Ketoglutarat, Succinat, Fumarat, Malat), glycolytische Metabolite (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, Ribulose-5-phosphat, Pyruvat), die Aminosäuren Prolin, Valin und Homoserin, -Derivat (Pantothenat), Lactat, 1-Monooleoylglycerol, Nicotinamid sowie Uridin. Dagegen liegen Intermediate der unteren Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (Chorismat, Tryptophan), des Zitronensäurezyklus und Glyoxylat-Wegs (cis-Aconitat, Isocitrat, Glyoxylat, Oxalat), Nukleinbasen (Cytosin, Adenin, Adenosin), Zucker (Trehalose, Maltose) sowie die Aminosäuren Aspartat, Glutamat und 5-Oxoprolin reduziert vor.

Tab. 17. Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der exponentiellen und stationären Wachstumsphasen der Quinat-Fermentation

Metabolite	Mittelwert exponentiell	Standard- fehler	Mittelwert stationär	Standard- fehler	Faktor exp/ stat.
1-Monooleoylglycerol	280	34	0	0	
3,4-Dihydroxybenzoat	5852	485	0	0	
3-Dehydroshikimat	221	41	0	0	
Fructose-1,6-bisphosphat	4044	1299	0	0	
Fructose-6-phosphat	565	142	0	0	
Pantothenat	90	5	0	0	
Prephenat	84	5	0	0	
Ribulose-5-phosphat	195	20	0	0	
Quinat	2305110	44213	30339	2678	75.98
Prolin	113273	23725	9843	631	11.51
Malat	551060	24120	55551	7642	9.92
Citrat	51875	2263	5901	602	8.79
Fumarat	22123	5473	2702	351	8.19
Lactat	445759	66460	61607	7359	7.24
Uridin	76465	7227	12659	532	6.04
Succinat	403552	79941	75840	9745	5.32
Homoserin	19466	4435	4892	514	3.98
α -Ketoglutarat	28274	6241	7213	919	3.92
Nicotinamid	8610	2046	2432	327	3.54
Valin	227058	43644	70467	8492	3.22
Glucose-6-phosphat	3173	617	9568	1537	3.01
Shikimat	64300	10497	21874	3428	2.94
Pyruvat	9290	2562	3486	415	2.66

Metabolite	Mittelwert exponentiell	Standard- fehler	Mittelwert stationär	Standard- fehler	Faktor exp/ stat.
Serin	48204	13540	19667	2077	2.45
Threonin	18409	4622	8058	725	2.28
6-Phosphogluconat	792	114	385	64	2.06
Uracil	17263	2470	8573	1352	2.01
Trehalose	163084	14760	18341250	2095920	0.009
Adenin	78	5	1475	163	0.06
Maltose	1521130	26621	21707760	24006900	0.08
Glutamat	18490200	262620	241316100	2400690	0.08
Cytosin	15312	1354	111997	1477	0.14
5-Oxoprolin	1340090	108052	8676210	264598	0.15
Chorismat	62	4	385	48	0.16
cis-Aconitat	56	9	218	22	0.26
Asparat	743810	121855	2725432	103943	0.27
Glycin	2296	420	8278	860	0.28
Oxalat	132	30	375	26	0.35
Isocitrat	52	3	145	13	0.36
Adenosin	667	99	1469	151	0.45
Glyoxylat	483	100	959	38	0.50

Die signifikante Akkumulation von Quinat, 3-Dehydroshikimat sowie 3,4-Dihydroxybenzoat in der exponentiellen Wachstumsphase, verglichen mit der stationären, verdeutlicht den Eintritt von Quinat in die Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese, da diese Metabolite in den bereits in meiner Diplomarbeit durchgeführten Fermentationen auf Glucose, Fructose, Lactat, Acetat sowie Glutamin nicht detektiert werden konnten. Die alleinige Kohlenstoffquelle Quinat wird über den β -Ketoacidweg (Brinkrolf et al., 2006) metabolisiert (Abb. 21). Daraus resultieren Acetyl-CoA sowie Succinyl-CoA, beides Intermediate des Zitronensäurezyklus, wobei Acetyl-CoA ferner ein bedeutendes Intermediat des Fettsäure-Metabolismus und der -Biosynthese darstellt. Dieser Katabolismus von Quinat kann anhand der in der exponentiellen Wachstumsphase verstärkt vorliegenden Intermediate des Zitronensäurezyklus verifiziert werden. Der Zitronensäurezyklus dient den katabolischen (Energiegewinnung) und anabolischen (Biosynthesen) Zwecken. Einerseits ist er verantwortlich für die vollständige Oxidation von Acetyl-CoA. Dieser Prozess generiert GTP und stellt dem membrangebundenen Respirationssystem Reduktionsäquivalente bereit. Andererseits liefert er Vorläufermetabolite, wie α -Ketoglutarat und Oxaloacetat für die Biosynthese von zum Beispiel Aminosäuren.

Ein antiparalleles Verhalten zu den in der exponentiellen Wachstumsphase akkumulierten Metabolite des Zitronensäurezyklus (Citrat, α -Ketoglutarat, Succinat, Fumarat, Malat) und des Vorläufers Pyruvat, weisen cis-Aconitat, Isocitrat, Glyoxylat sowie Oxalat, Intermediate des Zitronensäurezyklus sowie Glyoxylat-Wegs, wie in Abbildung 27 visualisiert, auf. Die relativen Zu- und Abnahmen der Metabolitkonzentrationen werden durch grüne Pfeile (Zunahme) sowie rote Pfeile (Abnahme) symbolisiert.

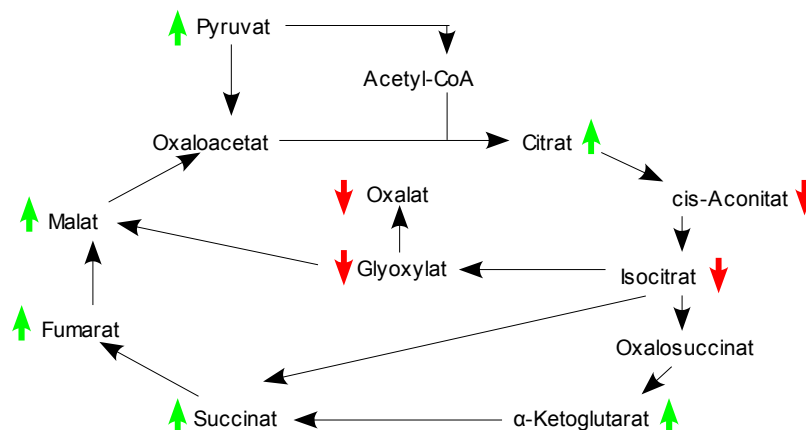


Abb. 27. Schematische Darstellung des Zitronensäurezyklus und Glyoxylat-Wegs, während der Kultivierung auf Quinat. Die Pfeile symbolisieren relative Zunahme (grün) und Abnahme (rot) von Metabolitkonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase, verglichen mit der stationären.

Das Verhalten der Intermediate des Zitronensäurezyklus sowie Glyoxylat-Wegs zeigt eine effiziente Generierung energiereicher Phosphatbindungen des Organismus in der exponentiellen Wachstumsphase und dient mit der nachgeschalteten Atmungskettenphosphorylierung der Energiegewinnung. Ferner liefert der Zyklus Vorstufen für die Synthese von neuem zelleigenem Material. Aufgrund der vermehrten Anreicherung der Zitronensäurezyklus-Intermediate kann auf eine effiziente Energiebilanz der Zellen während des exponentiellen Wachstums geschlossen werden.

Diese kann mit den hohen Konzentrationen von Glucose-6-phosphat sowie Fructose-6-phosphat in der exponentiellen Wachstumsphase erklärt werden, da für die Biosynthese ATP verbraucht wird. Weist die Zelle hingegen einen geringen ATP-Gehalt auf, so würde sich das Gleichgewicht in Richtung unphosphorylierter Verbindungen verschieben.

Ferner zeigt Abbildung 27 die bislang noch nicht dokumentierte Aktivität des Glyoxylat-Wegs in *C. glutamicum* ATCC 13032 unter Verwendung von Quinat als alleinige Kohlenstoffquelle.

Die Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Glycin weisen signifikant verringerte Konzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase der Quinat-Kultivierung auf, verglichen mit der stationären. Mögliche Gründe stellen die von Glutamat und Aspartat abzweigenden Synthesewege, beispielsweise dem Zitronensäurezyklus, dem Glycin-, Serin-, Threonin-Metabolismus und dem Purin-/Pyrimidin-Metabolismus, sowie die Glutamat-Überproduktion von *C. glutamicum* selber, dar. Die von diesen Aminosäuren abzweigenden Synthesewege werden auf dem Zusatzblatt mit den Stoffwechselwegen im Anhang zusammengefasst. Die Vermutung der abzweigenden Synthesewege kann mit den in der exponentiellen Wachstumsphase verstärkt vorliegenden Intermediaten des Zitronensäurezyklus (Abb. 27) belegt werden.

Im weiteren könnte die Akkumulation der Aminosäuren in der stationären Wachstumsphase von absterbenden Zellen herrühren, die über Transportsysteme von den noch lebenden Zellen importiert werden können sowie durch langsamere Proteinbiosynthese infolge des stationären Wachstums. Letzteres stellt einen möglichen Grund für die erhöhten Konzentrationen von Nukleosiden, wie Cytosin, Adenin und Adenosin, Bausteine der Desoxy- sowie Ribonukleinsäuren, dar.

Über den Vergleich semiquantitativer Metabolitkonzentrationen lässt sich in der Kultivierung auf Glucose sowie auf Quinat als alleinige Kohlenstoffquellen mit Hilfe der PCA sowie HCA eine Separierung in einzelne Wachstumsphasen erkennen (Abb. 22-24). Deutlich ist ein gesteigerter Konsum an Quinat verbrauchenden Prozessen in der exponentiellen Wachstumsphase der Quinat-Fermentation, wie die Bildung von 3-Dehydroshikimat und 3,4-Dihydroxybenzoat, ferner der Intermediate des Zitronensäurezyklus via β -Ketoacidweg, zu verzeichnen.

Dieses Gesamtbild der Kultivierung repräsentiert zudem die bislang noch nicht dokumentierte Fähigkeit von *C. glutamicum* ATCC 13032, den Glyoxylat-Weg unter Verwendung von Quinat als alleinige Kohlenstoffquelle zu aktivieren.

3.1.3.1 Vergleich der Metabolitkonzentrationen der Quinat- und Glucose-Fermentation in der exponentiellen Wachstumsphase

Um den Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Metabolom von *C. glutamicum* detaillierter zu analysieren, werden zunächst alle stündlich entnommenen Proben der Quinat-Kultivierung mit denen der Glucose-Kultivierung in einer PCA und HCA zusammengefasst und in Abbildung 28 dargestellt, um eine Clusterung der Proben zu erzielen.

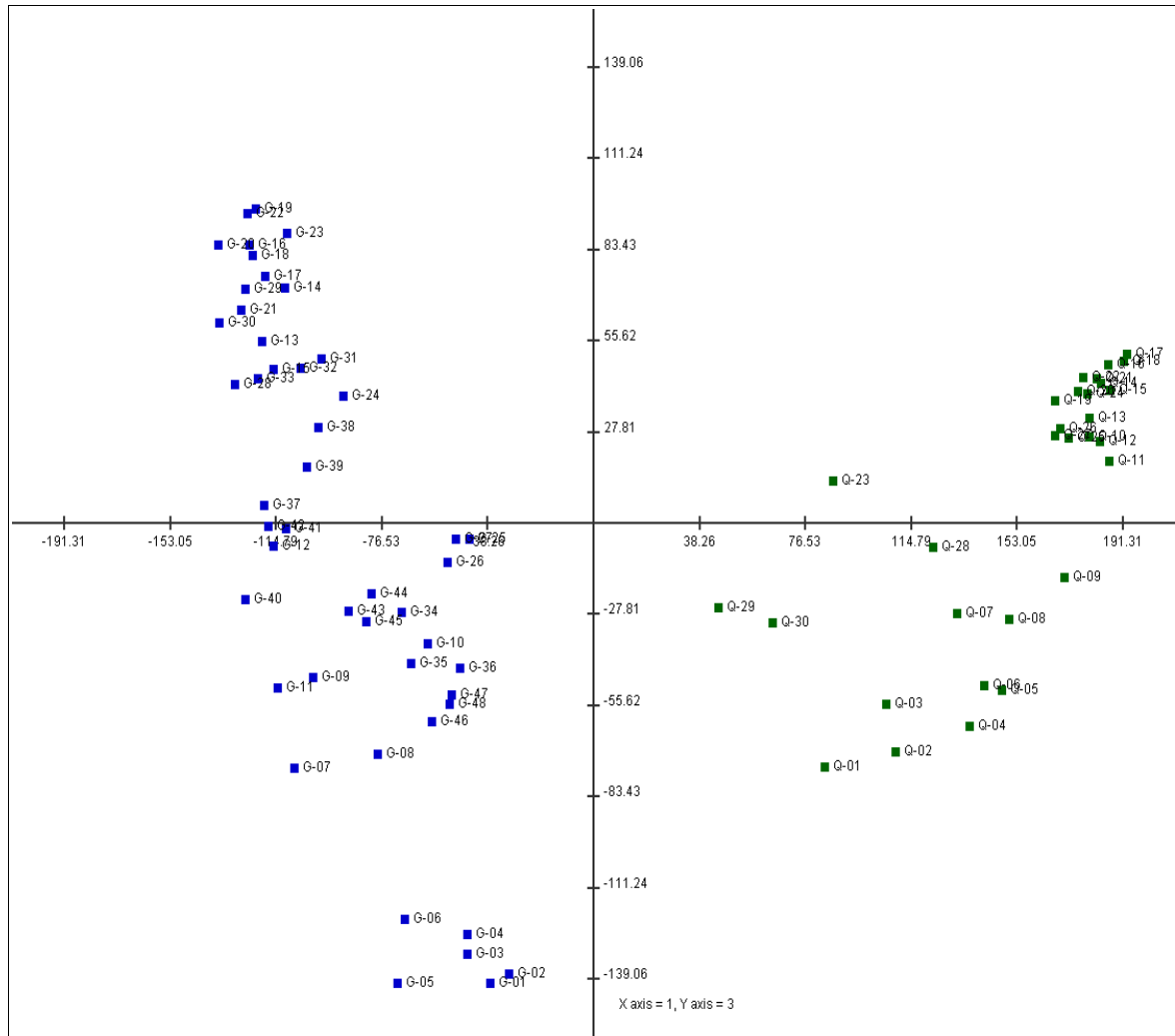


Abb. 28. Darstellung der normierten Metabolitkonzentrationen aller entlang der Wachstumskurve entnommenen Proben aus der Quinat- sowie Glucose-Fermentation. Die blauen Punkte symbolisieren die Proben der Glucose- und die grünen die der Quinat-Fermentation. Die 1. und 3. Komponente der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 43%.

Die in Abbildung 28 dargestellte PCA zeigt eine klare Separierung der Quinat- von der Glucose-Kultivierung. Das gleiche Bild konnte ebenfalls in der HCA in Abbildung 29 erzielt werden.

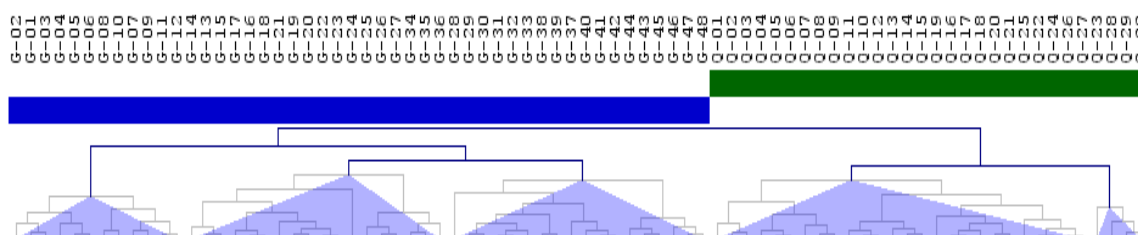


Abb. 29. Darstellung der normierten Metabolitkonzentrationen aller entlang der Wachstumskurve entnommenen Proben aus der Quinat (Q)- sowie Glucose (G)- Fermentation.

Ferner erfolgt in der HCA der Glucose-Kultivierung eine Gruppierung der Proben in drei Wachstumsphasen, die lag- (Proben 01-12), die exponentielle (Proben 13-27) sowie die Übergangsphase der spät-exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase (Proben 28-33, 37-48). Die Proben 34-36 stellen dabei eine Ausnahme und clustern mit den Proben der exponentiellen Wachstumsphase. In der Quinat-Fermentation erfolgt lediglich eine grobe Separierung in zwei Cluster, wobei das erste Cluster die Proben der lag- (Proben 01-09) und exponentiellen (Proben 10-22, 24-27) und das zweite Cluster die Proben der stationären Wachstumsphase (Proben 28-30) integriert. Die Probe 23 stellt einen Ausreißer dar und clustert mit den Proben des stationären Wachstums.

Mit der Einteilung in die einzelnen Wachstumsphasen (Abb. 22-25, 28, 29) sowie mit dem Kriterium der höchsten spezifischen Wachstumsrate (vgl. Kap. 3.1.1, Abb. 19B) konnten die Proben für den nachfolgenden Vergleich der Quinat- mit der Glucose-Kultivierung selektiert werden.

Die Analyse der relativen, semiquantitativen Metabolitkonzentrationen aus der exponentiellen Wachstumsphase der Quinat- sowie der Glucose-Kultivierung ergab 140 Targets (vgl. Kap. 3.1.2), die in beiden Fermentationen nachgewiesen werden konnten, davon liegen in der Quinat-Fermentation 45 Targets hoch- (Faktor > 2) und 54 herunterreguliert (Faktor < 0.5) vor. Zudem lieferte der Vergleich beider Fermentationen in der exponentiellen Wachstumsphase 28 Targets, die nur in der Quinat-Kultivierung und 44 Targets, die nur in der Glucose-Kultivierung, detektiert werden konnten.

In Tabelle 18 sind die Mittelwerte der semiquantitativen Intensitäten der Replikate der Quinat- und der Glucose-Fermentation aus der exponentiellen Wachstumsphase zusammengefasst. Durch die Division dieser Werte (Quinat/Glucose) resultiert ein Faktor der Metabolite, die in der Quinat-Fermentation hoch- (Faktor > 2) oder herunterreguliert (Faktor < 0.5) vorliegen. Die im Folgenden detaillierter diskutierten Metabolite und Enzyme sind in den Stoffwechselkarten im Anhang dargestellt.

Das Streudiagramm in Abbildung 28 zeigt den Vergleich von Quinat zu Glucose. Der für diesen Vergleich kalkulierte Korrelationskoeffizient nach Pearson ergibt einen Wert von 0.91. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen in der Quinat-Kultivierung liegt bei 15.5% und der Glucose-Kultivierung bei 10.4%.

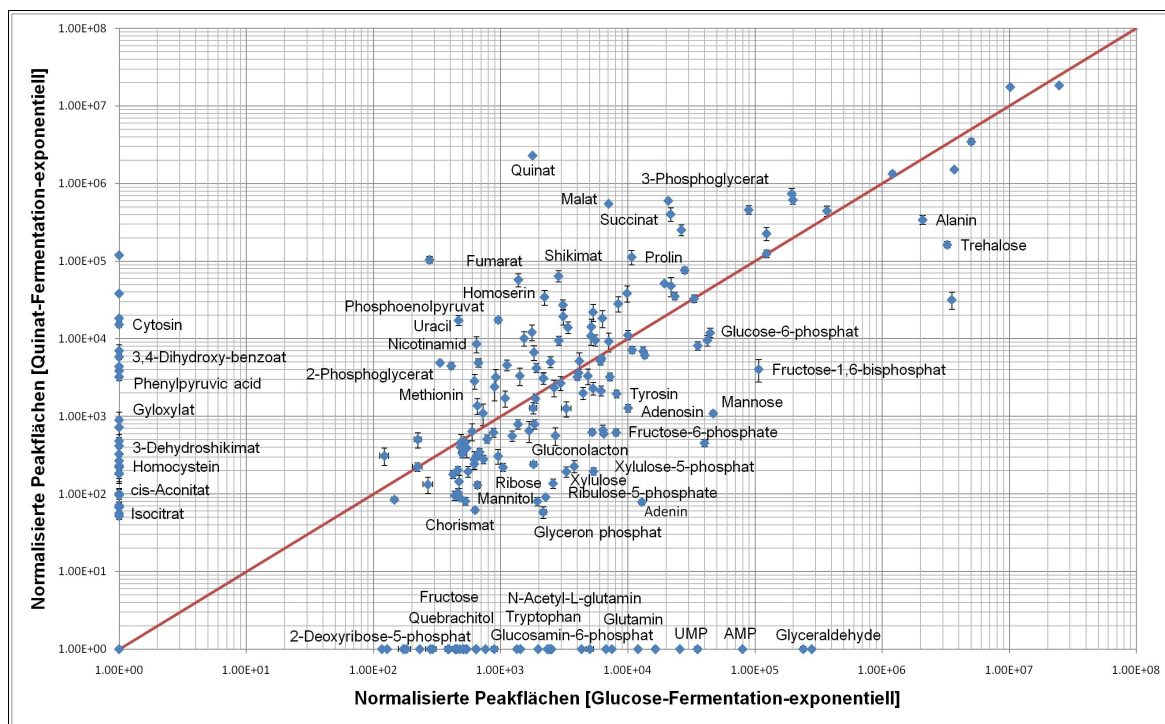


Abb. 30. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation gegen die Glucose-Fermentation in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

In der Quinat-Fermentation, verglichen mit der Glucose-Fermentation, akkumulieren in der exponentiellen Wachstumsphase Metabolite der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (Quinat, 3-Dehydroshikimat, 3,4-Dihydroxybenzoat, Shikimat, Phenylpyruvat) (Abb. 28), des Zitronensäurezyklus bzw. Glyoxylat-Wegs (cis-Aconitat, Isocitrat, Glyoxylat, Succinat, Fumarat, Malat), Intermediate der Glycolyse/Gluconeogenese (3-Phosphoglycerat, 2-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat), Aminosäuren (Aspartat, Homoserin, Homocystein, Methionin, Prolin, Threonin, Serine, β -Alanin, Ornithin, Leucin), Intermediate aus dem Pyrimidin-Metabolismus (Cytosin, Thymin, Uridin) sowie Nicotinamid.

Im Gegensatz dazu liegen in der Quinat-Fermentation, verglichen mit der Glucose-Fermentation, Zucker (Trehalose, Mannose, Ribose, Xylulose, Fructose), Zucker-Phosphate (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1,6-phosphat, Xylulose-5-phosphat, Ribulose-5-phosphat, 2-Deoxyribose-5-phosphat, Glucosamin-6-phosphat), Zuckeralkohole (Mannitol, Quebrachitol), Intermediate des Purin- und Pyrimidin-Metabolismus (AMP,

Adenosin, Adenin, UMP), Aminosäuren (Alanin, Glutamin, Tryptophan, Tyrosin) sowie Metabolite ebenfalls aus der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (Chorismat) signifikant reduziert vor.

Tab. 18. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat-, verglichen mit der Glucose-Fermentation bei exponentiellem Wachstum

Metabolite	MW Quinat exponentiell	Standard- fehler	MW Glucose exponentiell	Standard- fehler	Faktor Quinat/ Glucose
3,4-Dihydroxybenzoat	5851	485	0	0	
3-Dehydroshikimat	221	40	0	0	
cis-Aconitat	56	9	0	0	
Cytosin	15312	1354	0	0	
Glyoxylat	483	100	0	0	
Isocitrat	52	3	0	0	
Homocystein	227	52	0	0	
Leucin	38383	1279	0	0	
Phenylpyruvat	899	227	0	0	
Quinat	2305110	44213	1784	63	1292.00
Malat	551059	24120	7064	188	78.00
Phosphoenolpyruvat	57773	11050	1380	34	41.85
Uracil	17263	2470	466	16	36.98
3-Phosphoglycerat	602025	30315	20805	774	28.94
Shikimat	64299	10497	2851	24	22.55
Succinat	403552	79941	21704	643	18.59
Benzoat	17499	1407	957	34	18.28
Succinat monomethylester	34606	7478	2213	16	15.63
Nicotinamid	8610	205	646	23	13.32
Prolin	113273	23725	10724	174	10.56
2-Phosphoglycerat	10139	2072	1530	36	6.62
Homoserin	19466	4435	3102	52	6.27
Methionin	2857	617	623	21	4.58
Phenylalanin	9568	1554	2779	155	4.19
Fumarat	22123	5473	5329	81	4.15
Asparat	743810	121855	194543	1339	3.82
Thymin	915	21	3210	785	3.51
α -Ketoglutarat	28274	6241	8402	216	3.37
Threonin	18409	4622	6306	98	2.92
Uridin	27988	258	76464	7227	2.73
Citrat	51875	2263	19382	524	2.68
Serin	48203	1354	21839	229	2.21
β -Alanin	4197	556	1911	57	2.20
Ornithin	5027	785	2469	59	2.04

Metabolite	MW Quinat exponentiell	Standard- fehler	MW Glucose exponentiell	Standard- fehler	Faktor Quinat/ Glucose
UMP	0	0	25686	771	
Tryptophan	0	0	644	7	
Quebrachitol	0	0	174	3	
N-Acetyl-glutamin	0	0	640	9	
Glyceraldehyd	0	0	35280	1616	
Glutamin	0	0	5028	333	
Glucosamin-6-phosphat	0	0	891	47	
Fructose	0	0	533	15	
AMP	0	0	79785	752	
2-Deoxyribose-5-phosphat	0	0	172	15	
Adenin	78	5	12901	255	0.006
Mannose	1091	89	46954	1983	0.02
Glyceron phosphat	58	9	2160	120	0.03
Ribulose-5-phosphat	195	20	5379	83	0.04
Fructose-1,6-bisphosphat	4044	129	106920	4309	0.03
Trehalose	163084	14760	3253480	27802	0.05
Xylulose	137	19	2584	22	0.05
Ribose	194	30	3289	83	0.06
Lactose	620	64	8091	163	0.08
Chorismat	62	4	630	25	0.09
Adenosin	667	99	6318	94	0.10
Xylulose-5-phosphat	627	50	5239	90	0.12
Glucono lacton	242	13	1815	107	0.13
Alanin	341736	4631	2081560	34221	0.16
Pantothenat	90	5	477	23	0.19
Fructose-6-phosphat	565	142	2697	6	0.21
Mannitol	95	14	435	13	0.22
Glucose-6-phosphat	9568	1537	42241	446	0.23
Maltose	1521130	26621	3694080	21314	0.41
Glycin	2296	420	5330	60	0.43
Tyrosin	1961	225	4083	56	0.48
Ribose-5-phosphat	202	23	460	15	0.57
Glucose	6927	842	13194	286	0.52
Prephenat	84	5	146	7	0.57
6-Phosphogluconat	792	114	1369	43	0.58

Die signifikante Akkumulation der Intermediate der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (Abb. 30, Tab. 18) in der exponentiellen Wachstumsphase in der Quinat-Fermentation ist durch die Kultivierung auf Quinat zu erklären. Wird Quinat dem Kultivierungsmedium als alleinige Kohlenstoffquelle beigelegt, erfolgt daraus in *C. glutamicum* die Synthese aromatischer Aminosäuren, um diese zur Proteinbiosynthese nutzen zu können. Da der präzise Katabolismus von Quinat bislang noch nicht geklärt ist, kann angenommen werden, dass die Energiegewinnung über 3,4-Dihydroxybenzoat via β -Ketoadipatweg abläuft, der im Zitronensäurezyklus mit Acetyl-CoA und Succinyl-CoA sowie ferner in der Atmungskettenphosphorylierung endet (Shen et al., 2005). Infolgedessen lässt sich die Akkumulation der Intermediate des Zitronensäurezyklus sowie Glyoxylat-Wegs in der Quinat-Fermentation erklären. Auf diese Weise kann der Organismus Energie in Form von Reduktionsäquivalenten generieren.

Des Weiteren liegen lediglich drei glycolytische Komponenten verstärkt in der Quinat-Kultivierung vor. Dies lässt auf eine aktive Gluconeogenese schließen, um im Anschluss über den Pentosephosphatweg ebenfalls Reduktionsäquivalente in Form von NADP synthetisieren zu können.

Zu den erhöhten Intermediaten der oberen Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (Quinat, 3-Dehydroshikimat, 3,4-Dihydroxybenzoat, Shikimat) in der Quinat-Fermentation verhalten sich die Intermediate der unteren Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (Chorismat, Tryptophan, Tyrosin) entgegengesetzt. Dies könnte auf verstärkte und schneller ablaufende Stoffflüsse abzweigender Stoffwechselwege (vgl. Abb. 21), beispielsweise des β -Ketoadipatwegs und folglich des Zitronensäurezyklus, des Glyoxylat-Wegs oder der Gluconeogenese, hinweisen. Die Vermutung wird gestützt durch die in der Quinat-Fermentation in erhöhten Konzentrationen vorliegenden Intermediate dieser Stoffwechselwege.

Die Kombination der verstärkt vorliegenden Aminosäuren (Aspartat, Homoserin, Homocystein, Methionin, Prolin, Threonin, Serine, β -Alanin, Ornithin, Leucin), der akkumulierten Intermediate des Pyrimidin-Metabolismus (Cytosin, Thymin, Uridin), von Nicotinamid sowie die erhöhte Wachstumsrate bzw. verringerte Verdopplungszeit und den 5 Stunden früheren Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase der Quinat-Kultivierung, verglichen mit der Glucose-Kultivierung (vgl. Kap. 3.1.1 sowie Abb. 19B), lassen auf eine verstärkte Aminosäurebiosynthese- und folglich Proteinbiosynthese schließen.

In der Glucose-Fermentation, verglichen mit der Quinat-Fermentation, werden im wesentlichen Zucker und -phosphate sowie Intermediate des Pentosephosphatwegs mit

signifikant erhöhten Konzentrationen detektiert. Dies resultiert aus der Kultivierung auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle. Wie bereits in Kap. 1.5 beschrieben, wird Glucose über das Phosphotransferase-System in die Zelle transportiert, zu Glucose-6-phosphat konvertiert und in die Glycolyse oder den Pentosephosphatweg eingeleitet (Yokota & Lindley, 2005; Eggeling & Bott, 2005). Die Erhöhung dieser Intermediate, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1,6-phosphat, Xylulose-5-phosphat, Ribulose-5-phosphat, 2-Deoxyribose-5-phosphat, Glucosamin-6-phosphat (vgl. Kap. 3.1.3.1) sowie des Purin-Metabolismus (AMP, Adenosin, Adenin, UMP) stehen in direkter Relation mit einer effizienten Energiebilanz und erhöhter Biomasseproduktion (Abb. 19) von *C. glutamicum* während der Kultivierung auf Glucose.

3.1.3.2 Vergleich der Metabolitkonzentrationen von sechs Fermentationen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen im exponentiellen Wachstum

Grundlage für den nachfolgenden Vergleich der Metabolitkonzentrationen diverser Fermentationen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, war die Metabolomanalyse aus meiner Diplomarbeit (2005). Darin wurde der Einfluss verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen (Glucose, Fructose, Acetat, Lactat, Glutamin) auf das Metabolom von *C. glutamicum* quantitativ und qualitativ mittels gekoppelter GC-Q-MS-Technik untersucht. Die Kultivierungen wurden ebenfalls in einem 5 L Fermenter mit 3 L Medium durchgeführt und es wurden stündlich entlang der Wachstumskurve Proben geerntet, aufgearbeitet und vermessen.

Um zu analysieren, ob sich die Quinat-Fermentation signifikant von den anderen Fermentationen mit Fructose, Acetat, Lactat oder Glutamin als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle distanziert, werden relative, semiquantitative Metabolitkonzentrationen des Zentralstoffwechsels aus der exponentiellen Wachstumsphase miteinander verglichen und in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tab. 19. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite der Glucose-, Fructose-, Quinat-, Acetat-, Lactat- und Glutamin-Fermentation bei exponentiellem Wachstum

Metabolite	Quinat	Glucose	Fructose	Acetat	Lactat	Glutamin
2-Deoxyribose-5-phosphat	0	172	919	0	0	0
2-Phosphoglycerat	10139	1530	0	117220	0	273949
3-Phosphoglycerat	602025	20805	0	3065	0	10347
6-Phosphogluconat	792	1369	1908	0	73	0

Metabolite	Quinat	Glucose	Fructose	Acetat	Lactat	Glutamin
Fructose	0	533	103575	3305	9384	7715
Fructose-1,6-bisphosphat	4044	106920	160827	243	64	0
Fructose-6-phosphat	565	2697	64182	1712	1560	782
Glucono lacton	242	1815	9208	1322	3307	2725
Glucose	6927	13194	13691	10646	2604	4351
Glucose-6-phosphat	9568	42241	26490	9669	8848	743
Glyceraldehyd	0	35280	0	0	0	0
Glyceron phosphat	58	2160	12144	321	268	18
Phosphoenolpyruvat	57774	1380	0	7324	0	53592
Ribose	194	3289	8214	2800	8341	3887
Ribose-5-phosphat	203	460	7682	15078	13131	10163
Ribulose-5-phosphat	195	5379	4834	935	2020	31
Xylulose	137	2584	5179	523	1525	1283
Xylulose-5-phosphat	627	5239	9110	1036	12783	172
α -Ketoglutarat	28274	8402	6394	14401	931	10725
cis-Aconitat	56	0	0	0	0	0
Citrat	51875	19382	6660	15198	31855	20638
Fumarat	22123	5329	3770	19191	22272	19933
Glyoxylat	483	0	0	0	0	0
Isocitrat	52	0	0	0	0	0
Malat	551060	7064	8797	30439	37556	21036
Pyruvat	9290	3545	23770	15412	4692	13583
Succinat	403552	21704	168660	283167	381275	186603
3,4-Dihydroxybenzoat	5852	0	0	0	0	0
3-Dehydroshikimat	221	0	0	0	0	0
Chorismat	62	630	0	0	0	0
Phenylpyruvat	899	0	0	0	0	0
Prephenat	84	146	0	0	0	0
Quinat	2305111	1784	0	0	0	0
Shikimat	64299	2851	10960	1346	3677	27716
Alanin	341736	2081560	681867	82181	264018	128245
Aspartat	743810	194543	557075	408558	915581	898250
β -Alanin	4197	1911	15401	40379	24552	8918
Glutamat	18490175	12325796	1560802	3060547	2213695	2132222
Glutamin	0	5028	681145	0	420680	0
Glycerat	2413	448	1757	1438	1923	1001
Homoserin	19467	3102	4491	11159	68401	7655
Isoleucin	11172	5010	62087	39156	148130	24358
Leucin	38383	0	87292	5027	121710	18012
Lysin	425041	61676	59911	680391	820367	467920
Malonat	5193	3048	68	33	109	27

Metabolite	Quinat	Glucose	Fructose	Acetat	Lactat	Glutamin
Methionin	2857	623	0	3402	0	671
Ornithin	5027	2469	67865	0	35914	0
Pantothenat	90	477	0	0	0	0
Phenylalanin	9570	2779	48969	21174	11207	17245
Prolin	113273	10724	26441	123951	252101	1922
Serin	48204	21839	22284	134225	240257	78121
Threonin	18410	6306	81515	57378	186775	63221
Tryptophan	0	644	7702	9970	0	322
Tyrosin	1961	4083	76985	58207	54675	32729
Valin	227058	61645	111194	337688	1129610	65088

Bei der Gegenüberstellung (Tab. 19) selektierter Metabolite aus dem Zentralstoffwechsel unter Verwendung verschiedener Medien kann deutlich der Einfluss der jeweiligen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen auf das Metabolom von *C. glutamicum* beobachtet werden.

Glucose wird über das Glucose-Phosphotransferasesystem in die Zelle als Glucose-6-phosphat eingespeist und mittels Glucose-6-phosphat-Isomerase [EC 5.3.1.9] zu Fructose-6-phosphat konvertiert. Demzufolge liegen, verglichen mit den anderen Kultivierungen, Intermediate aus der Glycolyse, der Gluconeogenese sowie dem Pentosephosphatweg in erhöhten Konzentrationen vor.

Fructose wird mittels des Fructose-Phosphotransferasesystems in die Zelle als Fructose-1-phosphat eingespeist. Für die Umsetzung von Fructose-1-phosphat in Fructose-1,6-bisphosphat (Dominguez et al., 1998) ist die Aktivität der 1-Phosphofructokinase (pfkB) erforderlich, die in der Fructose-Fermentation zu einem erhöhten Fructose-1,6-bisphosphat-Level führt. Daher weisen ebenfalls wie in der Glucose-Fermentation Intermediate der Glycolyse, der Gluconeogenese sowie des Pentosephosphatwegs erhöhte Konzentrationslevel auf.

Bei der Acetat-Kultivierung von *C. glutamicum* wird der Glyoxylat-Weg aktiviert (Wendisch et al., 2000), ebenso wie bei der Lactat- und Glutamin-Kultivierung, was mit den Metabolomanalysen in der Diplomarbeit nachgewiesen werden konnte. Acetat und Lactat könnten in der Höhe von Pyruvat einerseits in die Gluconeogenese und andererseits in den Zitronensäurezyklus sowie den Glyoxylat-Weg in den Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum* eingeleitet werden. Glutamin kann von *C. glutamicum* über zwei Stoffwechselwege assimiliert werden: zum einen über die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) [EC 1.4.1.13] und zum anderen über die Glutamin-Synthetase/Glutamat-Synthase

(Glutamin-Synthetase/Glutamat-Oxoglutarat-Transferase, GS/GOGAT) [EC 6.3.1.2]. Durch Desaminierung des Glutamin zu Glutamat und α -Ketoglutarat erfolgt der Eintritt in den Zitronensäurezyklus und ferner in den Glyoxylat-Weg. Dadurch bedingt zeigen die Intermediate des Zitronensäurezyklus sowie der Aminosäuren unter Verwendung von Acetat, Lactat und Glutamin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, verglichen mit den anderen Kultivierungen, deutlich erhöhte Konzentrationslevel auf.

Quinat hingegen wird in die Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese eingespeist und über den β -Ketoacidweg sowie über die Aromaten-Biosynthese verstoffwechselt, was die signifikante Akkumulation von beispielsweise 3,4-Dihydroxybenzoat, 3-Dehydroshikimat, Shikimat und Phenylpyruvat erklärt.

Entgegen der Erwartungen ist in der Quinat-Fermentation, verglichen mit den anderen Kultivierungen, auffällig, dass die Konzentrationen der Aromaten Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan signifikant reduziert vorliegen. Das steht in direkter Relation mit den Aromaten-katabolisierenden Stoffwechselwegen, die in den Zitronensäurezyklus münden und korreliert mit den erhöhten Konzentrationen von beispielsweise Malat, Citrat, cis-Aconitat, Isocitrat, Glyoxylat sowie Succinat.

Im Gegensatz dazu wird deutlich, dass die Aromaten Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in den Fermentationen mit Glucose, Fructose, Acetat, Lactat und Glutamin anabolisiert und nicht katabolisiert werden, was mit dem Eintritt der jeweiligen Nahrungsquelle in den Stoffwechsel von *C. glutamicum* begründet werden kann.

3.1.4 *C. glutamicum* bei Wachstum auf Quinat mit variiertem Sauerstoffpartialdruck

Um den bereits in Kapitel 3.1.1 beschriebenen erhöhten Sauerstoffbedarf von *C. glutamicum* bei Wachstum auf Quinat und den möglicherweise damit in Zusammenhang stehenden Farbumschlag metabolisch zu analysieren, wurde innerhalb des Wachstums auf Quinat der Sauerstoffpartialdruck, pO_2 (in %) im Fermenter, modifiziert. Es wurden zu Beginn der Kultivierung stündlich, im Verlauf der Sauerstofflimitation (für eineinhalb Stunden) 15 minütig und nach Erhöhung des pO_2 -Wertes wieder stündlich Proben für die anschließende GC-Q-MS-Analyse entnommen.

Allerdings stellt die Limitierung des Sauerstoffgehaltes im Kulturmedium für das strikt aerob lebende Bakterium *C. glutamicum* ATCC13032 eine Herausforderung dar. Für die aerobe Energiegewinnung benötigen Zellen elementaren Sauerstoff. Für eine anaerobe

Lebensweise können alternative Elektronenakzeptoren, beispielsweise NO_3^- , in der Denitrifikation, wie bei *P. aeruginosa*, verwendet werden. Bislang wurden in *C. glutamicum* allerdings keine Gene, die für die Denitrifikation nötig wären, gefunden. Somit ist das Überleben von *C. glutamicum* unter anaeroben Bedingungen nicht möglich.

Die Kultivierung auf Quinat in einem Fermenter zeigt über den gesamten Fermentationszeitraum hinweg eine charakteristische milchig-gelbe Farbe (Fermenter), wie in Abbildung 29 zu erkennen. In einem neben dem Fermenter stehenden Erlenmeyerkolben mit dem Mediumabfall der laufenden Quinat-Fermentation stellte sich nach 4-5 Stunden eine rötlich-violette Färbung desselben ein (Abb.29).



Abb. 31. Quinat-Fermentation von *C. glutamicum* mit separat gesammeltem Mediumabfall. Verfärbung des Abfallmediums stellte sich nach 4 - 5 Stunden ein.

Infolge der rötlich-violetten Färbung des Mediumabfalls während einer Quinat-Fermentation (Abb. 29) sollte anhand von Kultivierungen auf Quinat in Schikanekolben ein optimaler Zeitpunkt mit der schnellsten Verfärbungsrate des Kulturmediums festgelegt werden, um diesen anschließend auf den Fermenter übertragen zu können. Dazu wurden aus einer laufenden Quinat-Kultivierung im Fermenter stündlich 20 ml Kultur in jeweils einen 100 ml Schikanekolben überführt und bei 30°C (180 rpm) inkubiert bis sich eine rötlich-violette Verfärbung des Mediums in den jeweiligen Schikanekolben einstellte.

Deutlich zu erkennen ist die sich verringernde Zeitspanne der Verfärbung der Quinat-Kultur in Abbildung 32. Die schnellste Verfärbung trat bei der Probe auf, die nach 6 Stunden Kultivierung im Fermenter in Schikanekolben überführt wurde. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die *C. glutamicum* Kulturen im exponentiellen Wachstum und annähernd an dem Punkt mit dem höchsten spezifischen Wachstum (Abb. 20b).

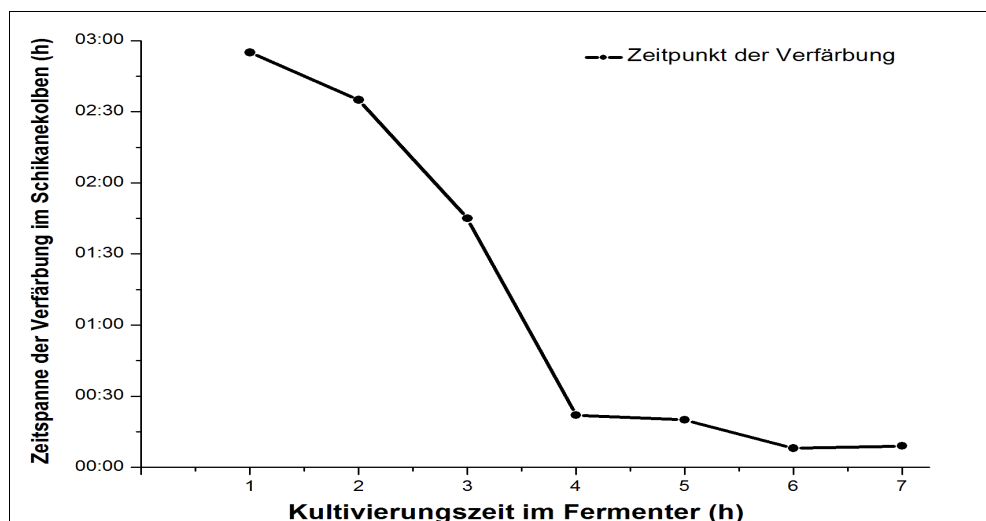


Abb. 32. Graphische Darstellung der Zeitspanne der Verfärbung nach Kulturentnahme aus der Quinat-Kultivierung im Fermenter.

Mit diesen Ergebnissen konnte ein Fermentationsansatz geplant werden, bei dem die Verfärbung im großen Maßstab reproduziert werden sollte. Dazu sollte, während des exponentiellen Wachstums einer Quinat-Kultivierung in einem 5 L Fermenter mit 3 L Medium, vor Erreichen des Zeitpunktes mit der schnellsten Verfärbungsrate eine abrupte Limitierung der Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium von 30% auf 0% vorgenommen werden.

Die Fermentationsparameter (vgl. Kap. 2.4.3.5; Tab. 14) der Quinat-Kultivierung mit modifiziertem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) sind in Abbildung 33 visualisiert und folgend erläutert. Anhand der Fermentationsparameter pO_2 (%) -Wert, Geschwindigkeit des Rührers, Säure- und Basepumpe sowie der Wachstumskurve konnte die Regulation der Fermentation über deren gesamten Verlauf nachvollzogen werden. Diese wurden im Vorfeld der Fermentation auf Automatikbetrieb gesetzt, so dass keine manuelle Regulierung der Parameter, außer des Sauerstoffpartialdrucks, erfolgte. Der pH-Wert der Fermentation wurde durch die Säure- und Basezufuhr während der Kultivierung stabil auf $pH\ 7,0 \pm 0,1$ gehalten und ist nicht dargestellt.

Mit Limitierung des Sauerstoffeintrages in die Quinat-Fermentation nach 5,5 Stunden geht eine Verringerung der Geschwindigkeit des Rührers, eine geringere Säurezufuhr sowie eine annähernd gleichbleibende optischen Dichte der Kultur einher. Die Parameter passen sich der neuen Bedingung an. Durch Erhöhung des pO_2 -Wertes nach 2,5 Stunden Sauerstofflimitation auf 30% erfolgt eine Angleichung der Fermentationsparameter

innerhalb weniger Minuten an die „normalen“ Bedingungen. Dies zeigt eine Abhängigkeit der Parameter von der Sauerstoffzufuhr. Im Verlauf der Fermentation hat sich hingegen ein Parameter unabhängig davon verändert. Die Zufuhr der Base, die bis dahin nicht erfolgte, wird bei Erhöhung des pO_2 -Wertes in den Fermenter eingeleitet.

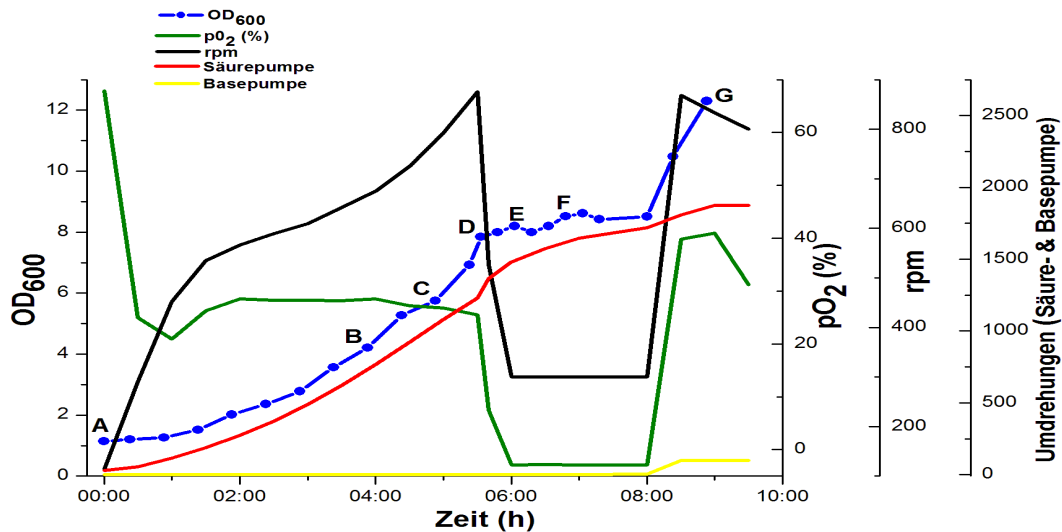


Abb. 33. Fermentationsparameter während der Kultivierung von *C. glutamicum* auf Quinat mit variiertem Sauerstoffpartialdruck. [A] 30% O_2 ; [B] 30% O_2 ; [C] 30%; [D] 15% O_2 ($t = 0\text{min}$); [E] 0% O_2 ($t = 30\text{min}$); [F] 0% O_2 ($t = 75\text{min}$); [G] 30% O_2 . Zeitangaben in Klammern nach Sauerstofflimitierung.

Zu jedem mit den Großbuchstaben A-G deklarierten Probenentnahmezeitpunkt entlang der Wachstumskurve (Abb. 33) wurde zusätzlich ein Foto der Kultur aufgenommen (Abb. 34). Ohne Sauerstofflimitierung zeigte die Kultur die charakteristische milchig-gelbe Färbung von *C. glutamicum*-Kulturen (Abb. 34 A-D). Bei Sauerstofflimitierung erfolgte eine spontane rötlich-violette Färbung des Kulturmediums (Abb. 34 E-F), die durch Erhöhung des pO_2 -Wertes innerhalb einer halben Stunde nicht mehr nachweisbar war (Abb. 34 G).

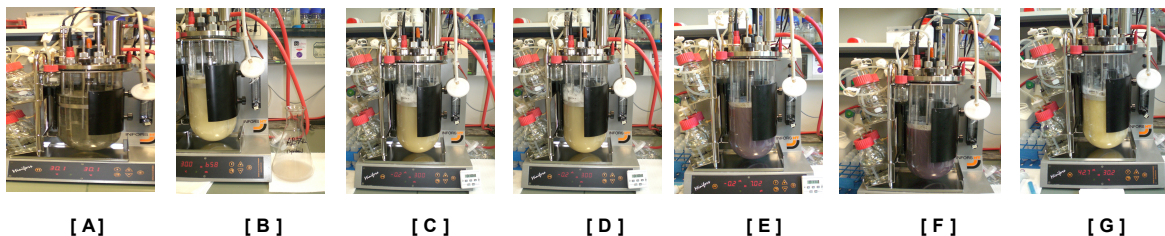


Abb. 34. Serienaufnahmen der Quinat-Fermentation von *C. glutamicum* mit variiertem Sauerstoffpartialdruck. [A] 30% O_2 ; [B] 30% O_2 ; [C] 30%; [D] 15% O_2 ($t = 0\text{min}$); [E] 0% O_2 ($t = 30\text{min}$); [F] 0% O_2 ($t = 75\text{min}$); [G] 30% O_2 . Zeitangaben in Klammern nach Sauerstofflimitierung.

Die spontane Entfärbung des Medium nach Erhöhung des pO_2 -Wertes könnte möglicherweise im Zusammenhang einerseits mit dem Sauerstoffeintrag in das Kulturmedium und andererseits mit der parallelen Zufuhr der Base in den Fermenter stehen. Wird nach einer halben Stunde die ursprüngliche Färbung (Abb. 34 G) erzielt, kommt die Zufuhr der Base zum Erliegen (Abb. 33).

Anhand verschiedener Experimente sollte eine detailliertere Bestimmung der Farbausschlag-erwirkenden Komponente erzielt werden. Nach Abzentrifugation der dem Fermenter zum Zeitpunkt F (Abb. 33) entnommenen Kultur wurde deutlich, dass die rötlich-violette Färbung im zellfreien Überstand lokalisiert ist. Im Anschluss daran wurde ein UV-Vis-Spektrum (230 – 700 nm Wellenlänge) des zellfreien Überstandes aufgenommen, das ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 275 nm und einen zusätzlichen kleinen Peak bei 550 nm aufwies (Abb. 35). In einer Studie von Heller (2002) wurden Eisen-II-Polymerkomplexe anhand von UV-Vis-Spektroskopie detaillierter analysiert und resultierten in einem annähernd analogen Absorptionsspektrum. Infolgedessen könnte es sich möglicherweise um einen Eisen-Komplex handeln.

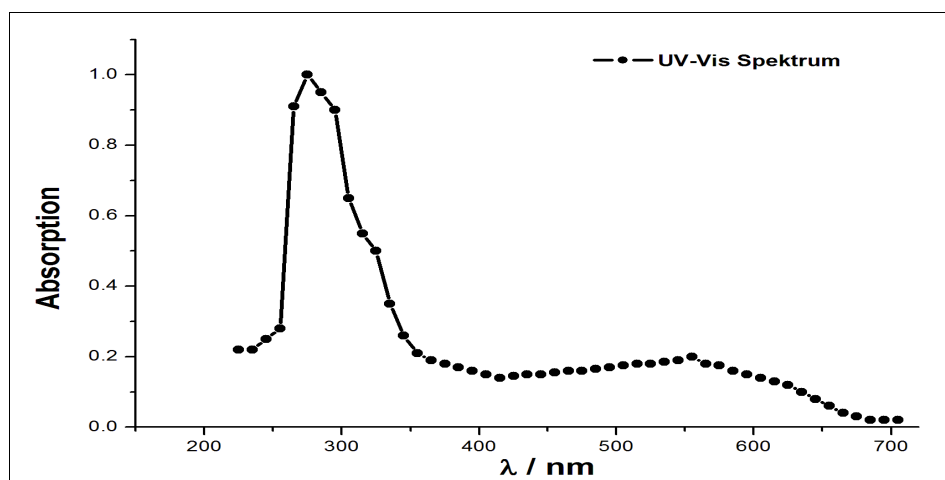


Abb. 35. UV-Vis-Spektrum der Verfärbung eines *C. glutamicum* Kulturüberstandes bei Wachstum auf Quinat.

In weiteren Experimenten konnte der mittels Rotation sowie unter Vakuum eingedampfte zellfreie Überstand unter Wasserzugabe vollständig aufgelöst werden. Die Löslichkeit in Methanol oder Ethanol war eingeschränkt, in Chloroform nicht vorhanden. Daher könnte es sich bei der fraglichen Komponente um eine hydrophile Substanz handeln.

Im Weiteren zeigten die zellfreien Überstände infolge längerer Inkubation an der Luft eine stärkere rötlich-violette Verfärbung auf. Dies weist auf eine erhöhte Sauerstoffanfälligkeit hin.

Ferner wurde unter Zugabe des Komplexbildners Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zum zellfreien Überstand eine spontane Entfärbung bewirkt. EDTA komplexiert zweiwertige Metallkationen, beispielsweise Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} sowie Fe^{2+} . Das bedeutet, das EDTA mit dem unbekannten Molekül um das Zentralion konkurriert. Der Komplex „Metall-unbekanntes Molekül“ ist farbig. Wird das Metall durch EDTA entzogen, entfärbt sich der zellfreie Überstand. Da Ca^{2+} , Mg^{2+} sowie Zn^{2+} keine farbigen Komplexe ausbilden können, können diese Substanzen als Komplexbeteiligte vernachlässigt werden. Komplexe mit Eisen (Fe^{2+}) hingegen generieren eine rötliche bis bräunliche Farbe. Unter Zugabe von Eisen (Fe^{2+}) nach bereits erfolgter EDTA-Zugabe zum zellfreien Überstand, wurde die rötlich-violett-bräunliche Farbe wieder hervorgerufen.

Zusammenfassend deutet die Analyse der Farbausschlag-erwirkenden Komponente unter Berücksichtigung des UV-Vis-Spektrums, der erhöhten Sauerstoffanfälligkeit sowie der Entfärbung durch EDTA-Zugabe bzw. Färbung bei Fe^{2+} -Zugabe auf einen Eisen-Komplex hin.

Um die Verfärbung des Überstandes einer *C. glutamicum*-Kultur zu verifizieren, bietet es sich an, einen Saurestoff-limitierten Fermentationsprozess auf einer weiteren Kohlenstoffquelle durchzuführen. Allerdings konnte weder auf Glucose noch auf einer der weiteren in meiner Diplomarbeit etablierten Kohlenstoffquellen (Fructose, Acetat, Lactat und Glutamin) eine rötlich-violette Verfärbung in einer Schikanekolben-Kultivierung oder Fermentation dokumentiert werden.

Daher kann festgehalten werden, dass die Verfärbung spezifisch für die Quinat-Kultivierung sowohl in Schikanekolben als auch im Sauerstoff-limitierten Fermentationsprozess von *C. glutamicum* ist. Eine Spekulation könnte sein, dass die Zellen von *C. glutamicum* unter Verwendung von Quinat als Kohlenstoffquelle eine Verbindung/Substanz ausschleusen, da diese Verfärbung lediglich im zellfreien Überstand lokalisiert ist. Außerdem könnte die wesentlich geringere Verdopplungszeit sowie der dadurch bedingt erhöhte Sauerstoffverbrauch der Zellen im Medium eine bedeutende Rolle spielen.

3.1.5 Grundlegende Beschreibung der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck

Innerhalb der Quinat-Fermentation mit variiertem pO_2 -Wert wurden, wie bereits erwähnt, entlang der Wachstumskurve (Abb. 32) zu Beginn der Kultivierung stündlich, im Verlauf der Sauerstofflimitation (für eineinhalb Stunden) 15 minütig und nach Erhöhung des pO_2 -Wertes wieder stündlich dem Fermenter Proben für die anschließende GC-Quadrupol-MS-Analyse entnommen. In 43 geernteten Proben konnten 223 Targets detektiert werden, wovon 80 unbekannte Substanzen darstellten.

Um die umfangreich erhobenen Metabolomdaten dieser Kultivierungen übersichtlich zu visualisieren, eignen sich die Hauptkomponentenanalyse (PCA) sowie die Hierarchische Clusteranalyse (HCA) (vgl. Kap. 2.8.5-2.8.6). Vor einer PCA sowie HCA erfolgte die Normierung der Metabolitdaten jeder Probe, um eine Normalverteilung nach Gauß zu erzielen.

Abbildung 36 stellt die dem Fermenter entnommenen Proben aus einer Quinat-Kultivierung mit variiertem pO_2 -Wert anhand einer PCA mit einer Gesamtvarianz von 40% dar. Dabei setzt sich die Farbcodierung wie folgt zusammen:

Die Proben 1-6 (grün) entsprechen der Adaptationsphase an das Medium mit einem pO_2 -Wert von 30% (lag-Wachstumsphase). Die Zellen besitzen eine optimale Sauerstoffversorgung, da zu diesem Zeitpunkt nur wenige Zellen im Medium vorliegen.

Die Proben 7-18 (blau) stellen die Proben der exponentiellen Wachstumsphase dar, die ebenfalls einen pO_2 -Wert von 30% aufweisen. Zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen infolge der gesteigerten Biomasseproduktion eine gute Sauerstoffversorgung.

Die Proben 19-21 (rot) spiegeln den Zeitpunkt der Sauerstoffreduktion wider und weisen einen pO_2 -Wert von ungefähr 15% auf.

Die Proben 22-37 (lila) reflektieren den Zustand mit einem pO_2 -Wert von 0%. Innerhalb dieser Gruppe bilden sich zwei Untercluster: die Proben 22-27 zeigen den Beginn und die Proben 28-37 die anhaltende Sauerstofflimitation an.

Proben 38-43 (orange) sind die Proben während der Erhöhung der Sauerstoffkonzentration auf einen pO_2 -Wert von 30%.

In Tabelle 20 sind die im Folgenden miteinander verglichenen Entnahmezeitpunkte aufgeführt, die bereits in den Abbildungen 33 und 34 mit Großbuchstaben markiert sind.

Tab. 20. Entnahmezeitpunkte in der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck mit der entsprechenden Probenbezeichnung sowie Sauerstoffkonzentration im Medium

Entnahmezeitpunkt	Probenbezeichnung	Sauerstoffkonzentration im Medium	Farbgebung in der PCA (Abb. 36) und HCA (Abb. 37)
A	1-3	30%	grün
B	13-15	30%	blau
C	16-18	30%	blau
D	19-21	15%	rot
E	25-27	0%	lila
F	34-36	0%	lila
G	41-43	30%	orange

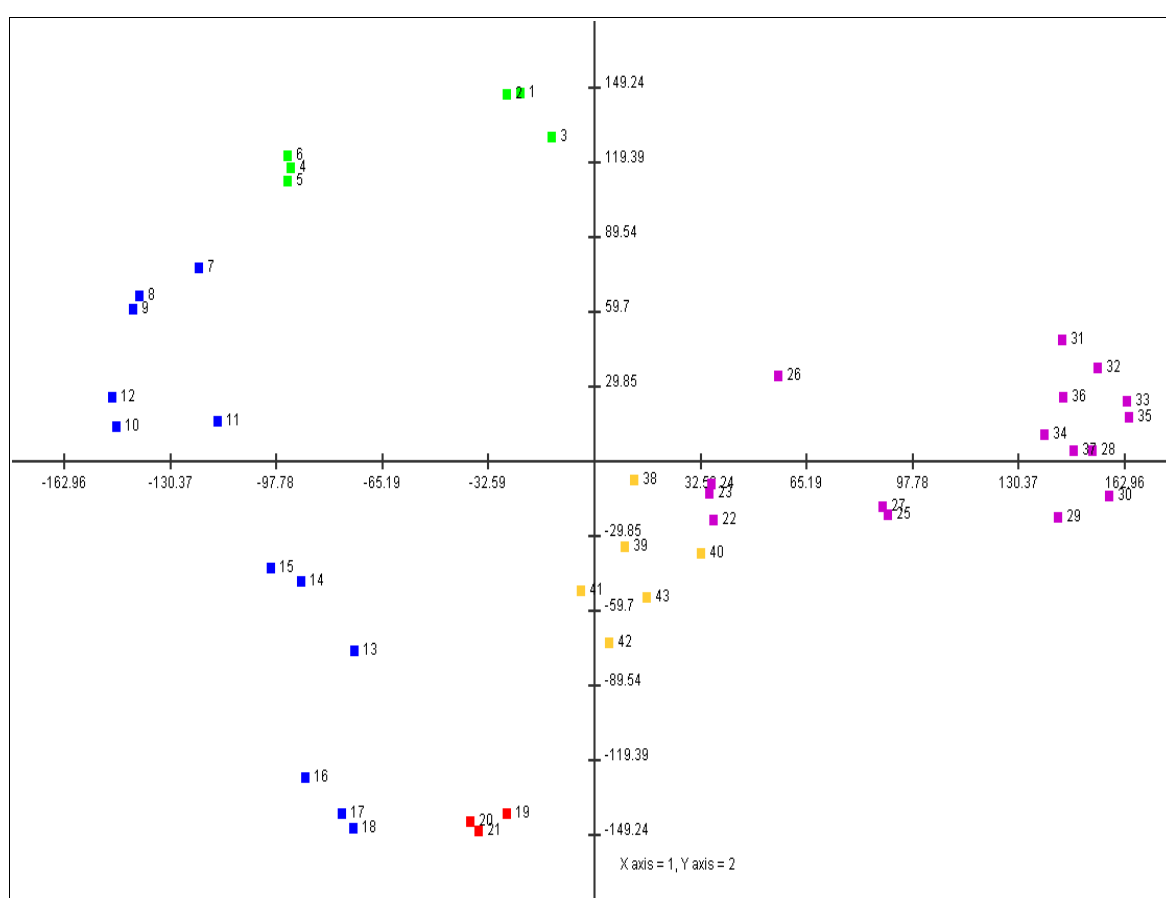


Abb. 36. Darstellung einer PCA der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck. Die Zahlen 1-43 symbolisieren die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung geernteten Proben. Die Farben entsprechen denen, die in Tab. 20 aufgeführt sind. 1. & 2. Komponente geben 40% der Gesamtvarianz wider.

Deutlich ist die Clusterung der drei Replikate eines jeden Probenentnahmezeitpunktes sowie die Anordnung der jeweiligen farbig unterlegten Cluster, die die einzelnen Zustände des pO₂-Wertes reflektieren, anhand der PCA in Abbildung 36 zu erkennen.

Anhand der präsentierten Ergebnisse dieser PCA (Abb. 36) können die einzelnen Zustände klar voneinander abgegrenzt werden. Der Zustand mit einem pO_2 -Wert von 0% (lila) setzt sich von den anderen Probenclustern ab. Bei dem Zeitpunkt der einsetzenden Sauerstoffreduktion (Proben 19-21), der den Übergangszustand zwischen einem pO_2 -Wert von 30% und 0% reflektiert, ist bereits eine geringe Distanzierung von den vorherigen Proben in der PCA zu beobachten. Des Weiteren ist zu erkennen, dass sich der Zustand nach Erhöhung des pO_2 -Wert auf 30% (orange) den Proben aus dem exponentiellen Wachstum (blau) annähern.

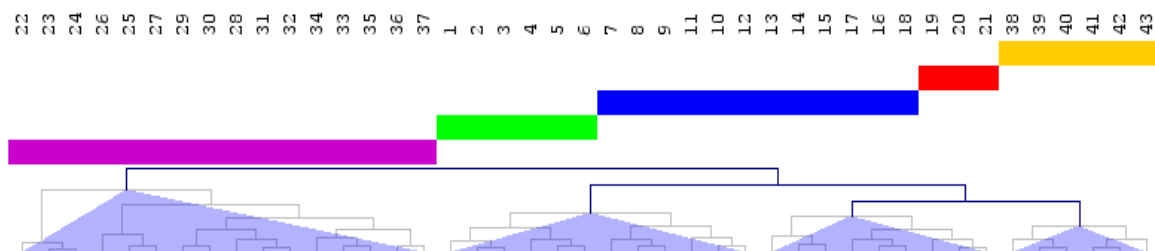


Abb. 37. Darstellung einer HCA der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck. Die Zahlen 1-43 symbolisieren die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung entnommenen Proben. Die Farben entsprechen denen, die in Tabelle 20 aufgeführt sind. Das Hauptcluster 1 setzt sich aus den Proben 1-21 und 38-43 und Hauptcluster 2 aus den Proben 22-37 zusammen.

Eine HCA dient, wie die PCA, der Mustererkennung sowie der Charakterisierung von Probengruppen und wird in einem Dendrogramm visualisiert. Abbildung 36 stellt eine HCA mit allen entlang der Wachstumskurve (Abb. 32) dem Fermenter entnommenen Proben dar, die analog in der PCA in Abbildung 36 verwendet wurden. Deutlich zu erkennen sind die offensichtlichen Parallelen zwischen diesen Methoden der unterschiedlichen Clusteranalyse. In der HCA kann zwischen zwei Hauptclustern unterschieden werden, die sich jeweils in weitere Untercluster aufteilen. Ein Hauptcluster wird von den Proben mit einem pO_2 -Wert von 30% gebildet sowie der Proben während der einsetzenden Sauerstoffreduktion (Proben 19-21 pO_2 -Wert von 15%). Die Proben 22-37, die wenigstens 30 Minuten der Sauerstofflimitierung ausgesetzt waren, formen das zweite Hauptcluster (Abb. 37).

Mit Hilfe der PCA und HCA kann ein Einfluss des Sauerstoffgehaltes des Kulturmediums auf den Metabolismus von *C. glutamicum* bereits deutlich gemacht werden. Denn die Proben unter Sauerstoff-limitierten Konditionen sind klar abgrenzbar von den Proben ohne Sauerstofflimitation. Das deutet darauf hin, dass *C. glutamicum* den Metabolismus an die Limitierung anpasst. Um dies genauer zu betrachten, werden im Folgenden die Veränderungen des Metaboloms analysiert.

3.1.6 Einfluss des Sauerstoffpartialdruckes des Kulturmediums auf das Metabolom von *C. glutamicum*

Um den Einfluss der Sauerstofflimitierung des Kulturmediums auf das Metabolom von *C. glutamicum* zu charakterisieren, wird ein Vergleich der relativen, semiquantitativen Metabolomdaten einzelner Entnahmezeitpunkte während der Kultivierung auf Quinat in einem 5 L Fermenter mit 3 L Medium angestellt und anhand von Streudiagrammen detaillierter beschrieben.

Die im Folgenden miteinander verglichenen Entnahmezeitpunkte und der entsprechende Sauerstoffgehalt des Kulturmediums der Zeitpunkte können den Abbildungen 33, 34 (vgl. Kap. 3.1.4) sowie Tabelle 20 (vgl. Kap. 3.1.5) entnommen werden.

Zunächst werden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die in Abbildung 33 mit den Großbuchstaben A-G gekennzeichneten Entnahmezeitpunkte kalkuliert (Tab. 21). Sie können dem Betrachter Hinweise liefern, inwiefern sich Analogien oder Differenzen in dem metabolischen Verhalten binnen der zu charakterisierenden Zeitpunkte abzeichnen.

Tab. 21. Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die in Abbildungen 33, 34 und Tabelle 19 mit den Buchstaben A-G gekennzeichneten Entnahmezeitpunkten

Zeitpunkte	A	B	C	D	E	F	G
A	1	0.910	0.918	0.916	0.925	0.925	0.92
B	0.910	1	0.993	0.992	0.972	0.934	0.975
C	0.918	0.993	1	0.999	0.987	0.925	0.988
D	0.916	0.992	0.999	1	0.985	0.925	0.988
E	0.925	0.972	0.987	0.985	1	0.993	0.973
F	0.925	0.934	0.925	0.925	0.993	1	0.975
G	0.921	0.975	0.988	0.988	0.973	0.975	1

Erwartungsgemäß weisen die Zeitpunkte mit dem gleichen Sauerstoffgehalt des Kulturmediums eine höhere Korrelation untereinander auf als die mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt. Eine Ausnahme stellt der Zeitpunkt A dar, der die Adaptationsphase der aus der Übernachtskultur stammenden Zellen an das Medium reflektiert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird Zeitpunkt A nicht weiter berücksichtigt. Aufgrund der hohen Korrelation von Zeitpunkt B mit C (0.993), die in der gleichen Wachstumsphase geerntet wurden und ferner das Kulturmedium zu diesen Zeitpunkten einen analogen Sauerstoffgehalt von 30% aufweist, wird auf eine Gegenüberstellung dieser Zeitpunkte verzichtet.

Infolge der sich ergebenden Korrelationskoeffizienten in Tabelle 20 wird im Anschluss mit der Charakterisierung des Entnahmezeitpunktes C mit D fortgesetzt.

Die in diesem Kapitel diskutierten Stoffwechselwege sind im Anhang (Zusatzblatt für *C. glutamicum* ATCC13032) dargestellt. Die Faktoren der hoch- und herunterregulierten Metabolite können den Tabellen 45 - 48 (S. 227-229) im Anhang entnommen werden.

Vergleich: Zeitpunkt C (pO₂-Wert 30%) mit Zeitpunkt D (pO₂-Wert 15%)

Im Folgenden werden die Metabolitdaten von zwei, mit einer Zeitdifferenz von einer Stunde geernteter Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase der Quinat-Fermentation (Zeitpunkt C (Proben 16-18) und D (Proben 19-21) (vgl. Abb. 33)) in einem Streudiagramm (Abb. 38; Tab. 45, S. 227) dargestellt. Zum Zeitpunkt D (Abszisse) wies das Medium infolge des noch im Medium gelösten Restsauerstoffs einen pO₂-Wert von 15% auf. Das Medium zum Zeitpunkt C (Ordinate) wies einen pO₂-Wert von 30% auf. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen liegt in der Quinat-Fermentation zum Zeitpunkt C bei 8.2% und zum Zeitpunkt D bei 10.6%.

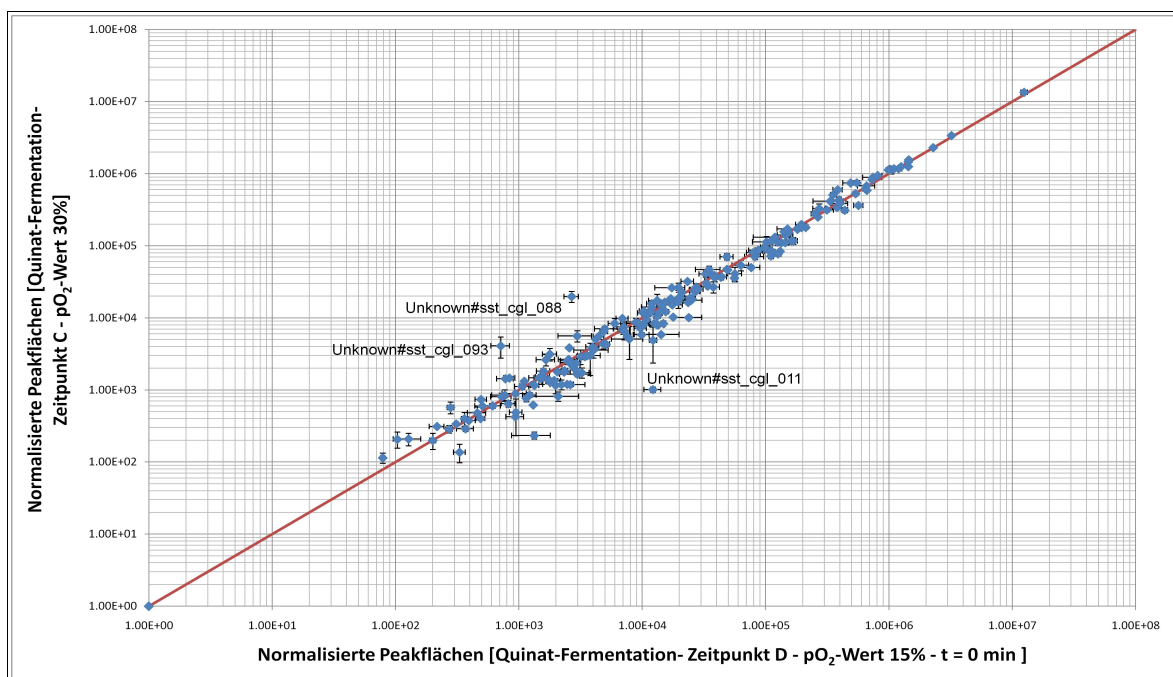


Abb. 38. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich zweier mit einer Zeitdifferenz von einer Stunde geernteter Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase. Zeitpunkt C besitzt einen pO₂-Wert von 30%, Zeitpunkt D einen von 15%. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Abbildung 38 visualisiert den Vergleich der beiden Zeitpunkte C und D. Dabei können lediglich geringe Unterschiede beobachtet werden, was durch den hohen Korrelationskoeffizienten (Tab. 21) von 0.99 bekräftigt wird. Die hohe Korrelation lässt darauf schließen, dass der Sauerstoffgehalt im Medium zum Zeitpunkt D noch keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf das Metabolom von *C. glutamicum* ausüben konnte. Nur bei drei unbekannten Substanzen konnten zum Zeitpunkt D abweichende Konzentrationen verzeichnet werden, auf die nicht näher eingegangen wird. Für die weiteren Vergleiche wird Zeitpunkt D als Referenz verwendet.

Vergleich: Zeitpunkt E (pO₂-Wert 0% - 30 min) mit Zeitpunkt D (pO₂-Wert 15% - 0min)

Nachfolgend wird der Zeitpunkt E (Proben 25-27), der einer 30 minütigen Sauerstofflimitation ausgesetzt war, dem Zeitpunkt D in einem Streudiagramm gegenübergestellt (Abb. 39, Tab. 46, S. 227). Dabei wird Zeitpunkt E auf der Ordinate und Zeitpunkt D auf der Abszisse abgebildet. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen liegt in der Quinat-Fermentation zum Zeitpunkt E bei 14.4%.

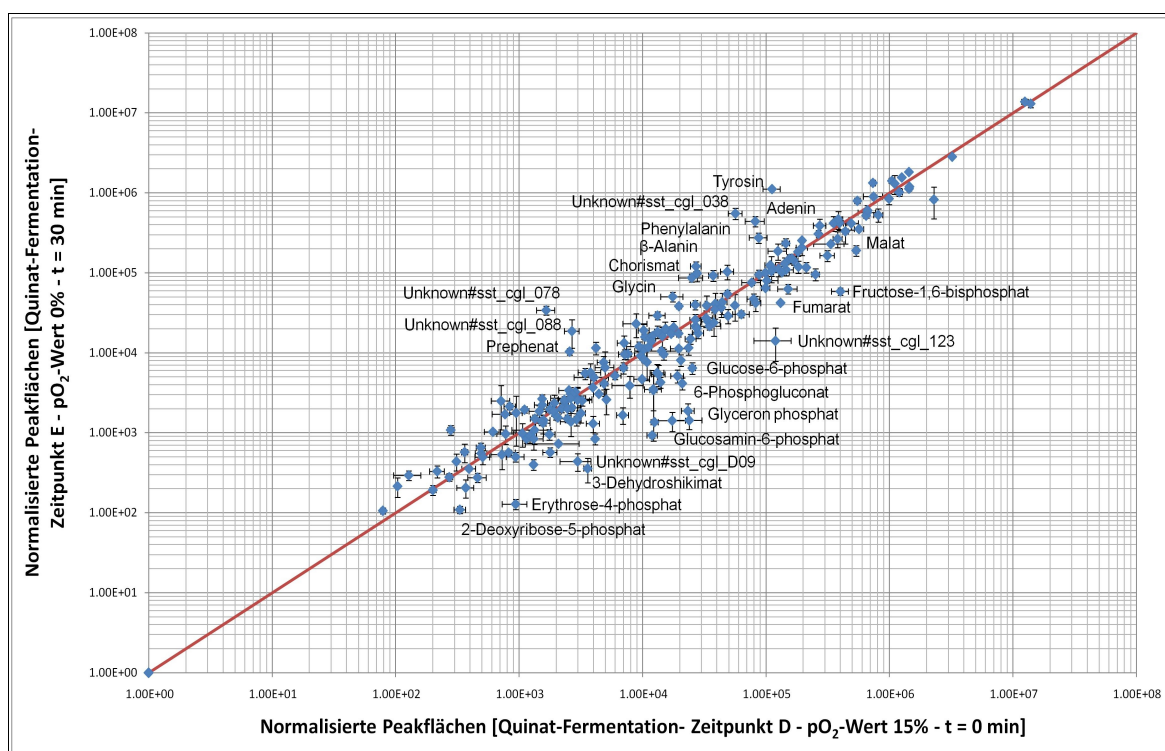


Abb. 39. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich zweier mit einer Zeitdifferenz von 30 Minuten geernteter Proben. Zeitpunkt E hat einen pO₂-Wert von 0% und D einen von 15%. Markierte Metabolite mit der Abweichung um Faktor >3.

Die nach Pearson kalkulierte Korrelation weist für den Vergleich der Zeitpunkte E mit D einen Wert von 0.985 auf.

Im Gegensatz zu dem in Abbildung 38 gezeigten Vergleich der Zeitpunkte C und D können in dem Vergleich der Zeitpunkte E mit D einige Unterschiede detektiert werden. Zum Zeitpunkt E akkumulieren vorwiegend Intermediate der unteren Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (Chorismat, Prephenat, Phenylalanin, Tyrosin), Aminosäuren (Glycin, β -Alanin, Ornithin), Adenin (Nukleotid) sowie drei unbekannte Substanzen. Dahingegen weisen Intermediate der oberen Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese (3-Dehydroshikimat, 3,4-Dihydroxybenzoat), der Glycolyse/Gluconeogenese (Glucose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, Glyceronphosphat), des Pentosephosphatwegs (6-Phosphogluconat, Erythrose-4-phosphat, 2-Deoxyribose-5-phosphosphat) sowie des Zitronensäurezyklus (Fumarat, Malat) verminderte Konzentrationen auf.

Auffällig ist die verstärkte Akkumulation der Intermediate der unteren Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese und der Aminosäuren zum Entnahmezeitpunkt E, bei dem die Zellen von *C. glutamicum* bereits einer 30-minütigen Sauerstofflimitierung ausgesetzt waren. Dies deutet auf eine geringere Umsetzung dieser Metabolite hin, was mit dem Sauerstoffmangel und dem dadurch hervorgerufenen Stress begründet werden könnte. Zudem liegen einige glycolytische Metabolite, beispielsweise Glucose-6-phosphat sowie Zitronensäurezyklus-Intermediate, wie Fumarat und Malat, zum Entnahmezeitpunkt E in geringeren Konzentrationen vor. Dies könnte in Zusammenhang mit einem Defizit im Ablauf der Glycolyse und des Zitronensäurezyklus stehen. Wird den Zellen von *C. glutamicum* der zum Überleben notwendige Sauerstoff für den Energiestoffwechsel entzogen, kann keine Atmungskettenphosphorylierung ablaufen und bedingt dadurch keine Regeneration der Reduktionsäquivalente. Infolgedessen kommt es zu einem geringeren Wachstum der Zellen mit dezimierter Proteinbiosynthese und Akkumulation der Aminosäuren.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen den bereits nach 30 Minuten Sauerstofflimitation deutlichen Einfluss auf das Metabolom der Zelle.

Im Folgenden wird das Metabolom von Zellen, die 75 Minuten der Sauerstofflimitation ausgesetzt waren, mit dem Referenzzustand verglichen.

Vergleich: Zeitpunkt F (pO₂-Wert 0% - 75 min) mit Zeitpunkt D (pO₂-Wert 15% - 0min)

In Abbildung 40 ist das Streudiagramm für den Vergleich der metabolischen Profile der Proben des Zeitpunktes F (Proben 34-36) und D gezeigt. Zeitpunkt F wird auf der

Ordinate und Zeitpunkt D auf der Abszisse dargestellt.

Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen zum Zeitpunkt F liegt bei 6.9%. Die Analyse der Zeitpunkte F und D mit unterschiedlichen pO_2 -Werten zeigt signifikante Abweichungen in den metabolischen Profilen (Abb. 40; Tab. 47, S. 228). Der nach Pearson kalkulierte Korrelationskoeffizient hat einen Wert von 0.925.

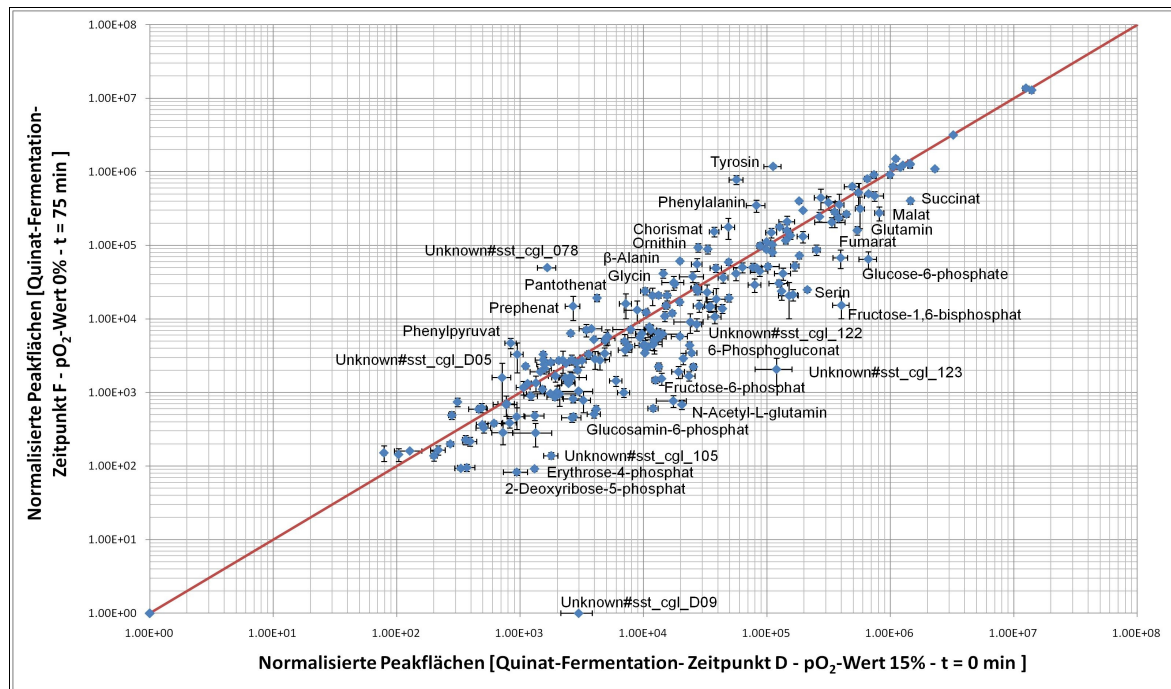


Abb. 40. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich zweier mit einer Zeitdifferenz von 75 Minuten geernteter Proben. Zeitpunkt F hat einen pO_2 -Wert von 0% und D einen von 15%. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Intermediate der unteren PPT-Biosynthese (Chorismat, Prephenat, Phenylpyruvat, Phenylalanin, Tyrosin), einige Aminosäuren (Glycin, β -Alanin, Ornithin), Pantothenat, Folgeprodukt von β -Alanin sowie zwei unbekannte Substanzen weisen zum Zeitpunkt F, verglichen mit D, erhöhte Konzentrationen auf. Im Kontrast dazu liegen Intermediate der Glycolyse/Gluconeogenese (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, Glyceronphosphat, 2-Phosphoglycerat, 3-Phosphoglycerat), des Pentosephosphatwegs (6-Phosphogluconat, Erythrose-4-phosphat, 2-Deoxyribose-5-phosphat), des Zitronensäurezyklus (Succinat, Fumarat, Malat) sowie Aminosäuren (Glutamin, Serin) und -Derivate (N-Acetyl-L-glutamin) in reduzierten Konzentrationen in Zustand F vor. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen bei dem Vergleich von Zustand E und D. Allerdings sind die Unterschiede deutlicher. Dies steht in direkter Relation mit dem vorherrschenden Sauerstoffmangel, der nach 75 Minuten noch ausgeprägter ist.

Vergleich: Zeitpunkt G (pO₂-Wert 30%) mit Zeitpunkt D (pO₂-Wert 15% - 0 min)

Abschließend wird ein Vergleich von Zustand G (Proben 41-43), bei dem die Sauerstoffkonzentration des Mediums wieder auf 30% gesetzt wurde, mit Zustand D (Abb. 41; Tab. 48, S. 228-229) analysiert. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen liegt zum Zeitpunkt G bei 13.0%. Der kalkulierte Korrelationskoeffizient für diesen Vergleich ergibt einen Wert von 0.988 und reflektiert, infolge geringer zu beobachtender Unterschiede in den metabolischen Profilen (Abb. 41), eine Angleichung des Zeitpunktes G an D.

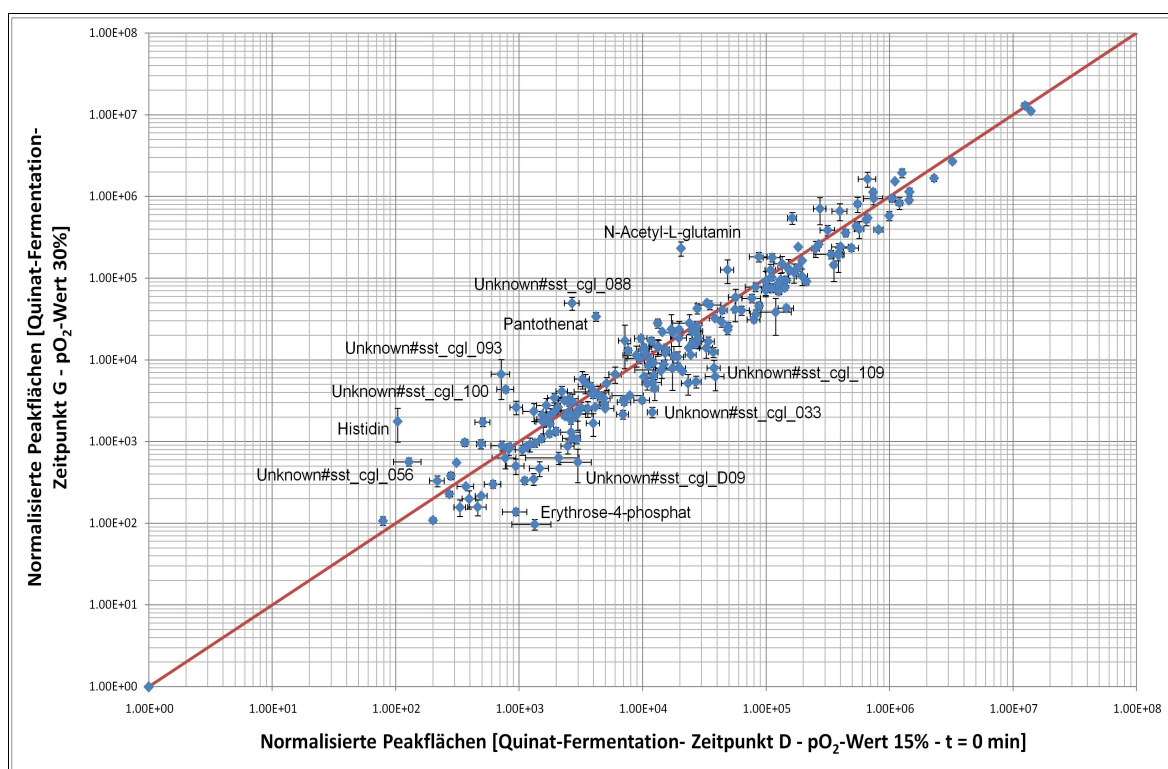


Abb. 41. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich zweier mit einer Zeitdifferenz von 3.5 Stunden geernteter exponentieller Proben mit einem pO₂-Wert von annähernd 30%. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Im wesentlichen zeigen unbekannte Substanzen, die Aminosäure Histidin, die Aminosäure-Derivate Pantothenat und N-Acetyl-L-Glutamin sowie das Zuckerphosphat Erythrose-4-phosphat Differenzen in ihren Konzentrationen zwischen G und D auf. Infolge der vorherigen Sauerstofflimitierung der Zellen und aus dem dadurch bedingten stagnierten Wachstum könnten die abweichenden Konzentrationen in den Aminosäuren und ihren Derivaten zum Zeitpunkt G resultieren.

Aufgrund der detektierten Unterschiede innerhalb der zwei Zeitpunkte G und D entspricht das metabolische Profil nicht dem Vergleich der Zeitpunkte C und D. Die Zeitpunkte G und D stammen aus der gleichen Wachstumsphase mit annähernd gleichem Sauerstoffgehalt des Kulturmediums und sollten dementsprechend eine höhere Analogie der metabolischen Profile zueinander aufzeigen. Dies könnte ein Indiz für eine noch unvollständige Adaptation der Zellen des Zeitpunktes G an die „alten“ Bedingungen sein. Jedoch konnten die zuvor in den Abbildungen 39 sowie 40 beschriebenen Konzentrationsunterschiede in den Aminosäuren, den Intermediaten des Zitronensäurezyklus sowie den glycolytischen Metaboliten in dem Vergleich der Zeitpunkte G und D (Abb. 41) nicht detektiert werden, was in Relation mit einem gleichermaßen effizienten Energiestoffwechsel beider Zeitpunkte steht.

3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1 *Charakteristiken der Referenzstämme PAO1, TBCF10839 sowie PA14 bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen*

Um nachfolgend eine detailliertere Analyse der Patientenisolate (vgl. Kap. 3.2.3) und Transposonmutanten (vgl. Kap. 3.2.5) gegenüber den Referenzstämmen PAO1, TBCF10839 sowie PA14 realisieren zu können, erfolgte im Vorfeld eine Charakterisierung des Wachstumsverhaltens und der metabolischen Profile der Referenzstämme aus der exponentiellen Wachstumsphase auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.

Dabei stellt der *P. aeruginosa*-Stamm PAO1, im Gegensatz zu TBCF10839 sowie PA14, einen nicht-mukoiden Stamm dar, der 1955 in Melbourne aus einer infizierten Wunde isoliert wurde (Holloway, 1955) (vgl. Kap. 1.4). TBCF10839 ist ein hoch virulenter *P. aeruginosa* Stamm, der 1983 aus dem Sputum eines an Cystischer Fibrose (CF) erkrankten Patienten isoliert wurde. Im Wesentlichen konnte TBCF10839 in CF- sowie Brandwunden-Patienten an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) in den 1980er Jahren identifiziert werden (Tümmler, 1987, Tümmler et al., 1991; Kiewitz & Tümmler, 2000; Wiehlmann, 2001; Wiehlmann et al., 2002). Allerdings ist bislang die exakte Genomgröße von TBCF10839 nicht bekannt. Der ebenfalls hoch virulente *P. aeruginosa* Stamm PA14, gleichermaßen ein klinisches Patientenisolat, weist eine Genomgröße von 6.5Mb, PAO1 (6.3Mb), auf. Ungefähr 91.7% des PA14 Genoms ist mit dem von PAO1 und 95.8% des PAO1 Genoms mit dem von PA14 identisch (Lee et al., 2006). PA14 besitzt ferner Gene (Pathogenitäts-Inseln), die seine erhöhte Pathogenität positiv beeinflussen, die in PAO1 jedoch nicht existieren (Tan et al., 1999; He et al., 2004; Lee et al., 2006).

Die Metabolomprofile der *P. aeruginosa*-Stämme werden in den Kohlenstoffquellen Trypton und Caseinaminosäuren (CasAA) als undefinierte Medien, Cadaverin, Glucose, Glucose-Methionin, Succinat sowie Citrat als Minimalmedien mit definierter Kohlenstoffquelle charakterisiert. Dabei reflektieren die undefinierten Medien ein belebtes Milieu und die Minimalmedien Nischen in natürlicher Umgebung. PAO1 und TBCF10839 wurden auf allen angeführten Kohlenstoffquellen, PA14 lediglich auf CasAA und Glucose-Methionin analysiert.

Die für die Abbildung verwendeten Metabolomdaten setzen sich jeweils aus zwei (Trypton), vier (Glucose-Methionin) bzw. sechs Replikaten (CasAA, Cadaverin, Glucose, Succinat, Citrat) zusammen. Die Proben aller Ansätze wurden in der exponentiellen

Wachstumsphase geerntet und die Kulturen weisen zu diesem Entnahmezeitpunkt die höchste spezifische Wachstumsrate auf (Kap. 2.4.2).

Die im Folgenden detaillierter diskutierten Proben der drei Referenzstämme der verschiedenen Versuchsansätze wurden zunächst in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase geerntet, aufgearbeitet und mittels des GC-Quadrupol-MS vermessen und anschließend ausgewertet. Die dabei detektierten Targets, aufgeteilt in bekannte Metabolite und Anzahl der nicht identifizierten Verbindungen sowie deren relativer Gesamtfehler der mittleren Metabolitkonzentrationen sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tab. 22. Tabellarische Übersicht über die verschiedenen Versuchsansätze der drei Referenzstämme in der exponentiellen Wachstumsphase

	Relativer Gesamtfehler			Detektierte Targets		Identifizierte Metabolite		Nicht identifizierte Verbindungen	
	PAO1	TBCF 10839	PA14	PAO1 TBCF10839	PA14	PAO1 TBCF10839	PA14	PAO1 TBCF10839	PA14
Trypton	14%	11%	---	192	---	121	---	71	---
Caseinaminosäuren	10%	8%	8%	184	180	139	140	45	40
Glucose	12%	14%	---	201	---	138	---	62	---
Glucose-Methionin	15%	12%	17%	185	179	131	126	53	53
Cadaverin	21%	19%	---	137	---	94	---	42	---
Succinat	8%	14%	---	198	---	131		66	---
Citrat	11%	8%	---	161	---	108	---	52	---

Der relative Gesamtfehler jedes Versuchsansatzes stellt den mittleren prozentualen Standardfehler der mittleren Konzentrationen der Replikate aller gemessenen Targets dar und bezeichnet die Reproduzierbarkeit der angewendeten Methode, begonnen mit der Ernte der Zellen.

Die detektierten Targets werden in zwei weitere Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe sind die bereits identifizierten Metabolite und in der zweiten die zwar detektierten, aber unbekannten Verbindungen, bei denen noch keine oder keine endgültige Identifizierung stattgefunden hat, aufgelistet. Die Anzahl identifizierter Verbindungen wird ohne internen Standard (Ribitol) und den Alkanmix angegeben.

In den Medien mit Trypton, CasAA, Glucose, Glucose-Methionin oder Succinat als alleinige Kohlenstoffquelle konnten in den Referenzstämmen PAO1, TBCF10839 und PA14 im Mittel 188 Targets detektiert werden, wovon 132 identifizierte Metabolite und 56 nicht identifizierte Verbindungen darstellen (Tab. 22).

Ausnahmen bilden die Medien mit Cadaverin und Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle. Dabei konnten in den Referenzstämmen PAO1 und TBCF10839 lediglich 137 Targets bzw. 161 Targets bei exponentiellem Wachstum auf Cadaverin bzw. Citrat nachgewiesen werden, wovon 94 (Cadaverin) bzw. 108 (Citrat) identifizierte Metabolite und 42 bzw. 52 nicht identifizierte Verbindungen beschreiben.

Ein Grund, dass bei Wachstum auf Citrat und Cadaverin deutlich weniger Metabolite detektiert wurden, zeigt auf, dass möglicherweise durch die Versendung der Proben, die in der MHH hergestellt wurden, eine Dekomposition der Metabolite während des Transports stattgefunden hat, was unweigerlich zu einem Verlust an Metaboliten führt. Außerdem weist die geringe Anzahl an detektierten Targets in der Cadaverin-Kultivierung hin, dass Cadaverin eine nicht präferierte Kohlenstoffquelle für *P. aeruginosa* darstellt.

Im Anschluss daran wurden die umfangreich erhobenen Daten-Matrizen der Metabolomanalyse aller Proben in einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) (Abb. 42) und Hierarchischen Clusteranalyse (HCA) (Abb. 43) integriert und beschrieben. Innerhalb der Darstellung einer PCA bzw. HCA repräsentiert jeder Punkt bzw. Strich ein Replikat des metabolischen Profils des entsprechenden Ansatzes. Zusätzlich erfolgt die Angabe einer Gesamtvarianz des Datensatzes, die aus den Hauptkomponenten abgeleitet wird. Dabei repräsentiert die erste die größte Varianz des Datensatzes und nachfolgende sich verringern Varianzen. Vor einer PCA bzw. HCA erfolgte die Normierung der Metabolitdaten jedes Replikates, um eine Normalverteilung nach Gauß zu erzielen.

Die Daten in einer PCA bzw. HCA clustern infolge ähnlicher Charaktere, so dass eine Klassifizierung von Daten unbekannter Struktur in aussagekräftige Gruppen resultieren kann. Infolgedessen sollte mit Hilfe dieser chemometrischen Statistik eine eventuelle Clusterung (Gruppierung) der verschiedenen Ansätze untersucht werden.

Abbildung 42 zeigt die Proben der drei Referenzstämmen in der exponentiellen Wachstumsphase auf verschiedenen Medien anhand einer PCA mit einer Gesamtvarianz der ersten zwei Komponenten von 45%. Deutlich zu erkennen ist die separate Clusterung der Versuchsansätze mit den undefinierten (Trypton, CasAA) sowie mit den definierten Kohlenstoffquellen (Glucose, Glucose-Methionin, Succinat, Citrat) zueinander. Eine Ausnahme stellt allerdings das Medium mit Cadaverin dar, das in der PCA mit dem Trypton-Medium ein einheitliches Cluster bildet und sich somit den Medien mit undefinierten Kohlenstoffquellen untergliedert.

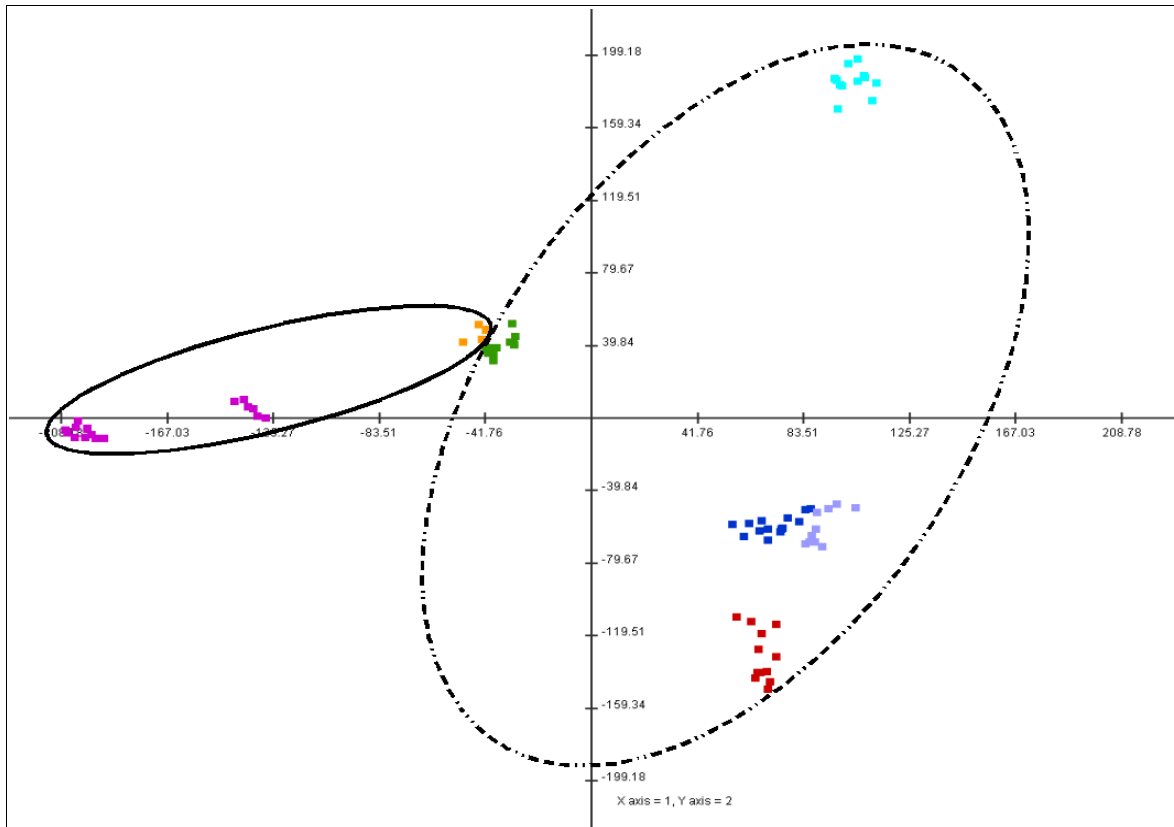


Abb. 42. PCA der Replikate der drei Referenzstämme im exponentiellen Wachstum. Die durchgezogene Linie umfasst die Medien mit undefinierter CasAA (pink), Trypton (orange), die gestrichelte Linie, die mit definierter Kohlenstoffquelle Citrat (hellblau), Cadaverin (grün), Glucose (blau), Glucose-Methionin (fliefder) sowie Succinat (rot). 1. und 2. Komponente bilden 45% der Gesamtvarianz.

Eine analoge Clusterung zu der in Abbildung 42 dargestellten PCA (vgl. Kap. 2.8.5) lässt sich mittels einer HCA (Abb. 43) erzielen (vgl. Kap. 2.8.6). Ebenfalls grenzen sich die Medien mit undefinierter (grüner Balken) von denen mit definierter (orangefarbener Balken) Kohlenstoffquelle, mit Ausnahme des Mediums mit Cadaverin, ab (Abb. 43).

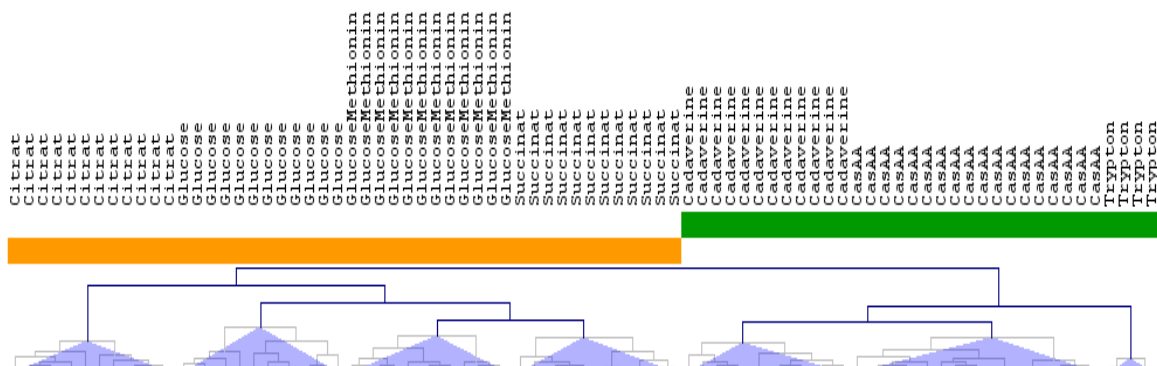


Abb. 43. PCA der Replikate der drei Referenzstämme aus dem exponentiellen Wachstum. Grobcluster durch orange und grüne Balken und Subcluster durch fliefderfarbene Dreikante markiert.

Die Ergebnisse der PCA sowie HCA verdeutlichen, infolge der separaten Clusterung der Medien, einen Referenzstamm-unspezifischen Nahrungsquellen-unabhängigen Stoffwechsel und zeigen an, dass die Referenzstämme die offerierten Kohlenstoffquellen äquivalent zueinander metabolisieren.

Auf dieser Hypothese aufbauend, wurden die Korrelationskoeffizienten der relativen Metabolitkonzentrationen der Referenzstämme aus der exponentiellen Wachstumsphase für die verwendeten Kohlenstoffquellen nach Pearson kalkuliert und in Tabelle 23 zusammengefasst. Die Anwendung von Korrelationskoeffizienten in der Metabolomanalyse kann Hinweise liefern, inwiefern sich Analogien oder Differenzen in dem metabolischen Verhalten, binnen der zu charakterisierenden Spezies (Organismen), abzeichnen.

Die Analyse der Korrelationskoeffizienten (Tab. 23) zeigt, infolge der bei dem Vergleich PAO1 und TBCF10839 erhaltenen Werte annähernd 1, mit Ausnahme der Kohlenstoffquelle Glucose, eine größere Ähnlichkeit der metabolischen Profile von TBCF10839 und PAO1 zueinander als TBCF10839 zu PA14 an.

Tab. 23. Vergleich der nach Pearson kalkulierten Korrelationskoeffizienten der relativen Metabolitkonzentrationen der Referenzstämme aus der exponentiellen Wachstumsphase bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Referenzstamm	PAO1 / TBCF10839	PAO1 / PA14	TBCF10839 / PA14
Kohlenstoffquelle			
Trypton	0.988	---	---
Caseinaminosäuren	0.983	0.913	0.907
Glucose	0.890	---	---
Glucose-Methionin	0.979	0.988	0.967
Cadaverin	0.993	---	---
Succinat	0.971	---	---
Citrat	0.988	---	---

Außerdem wurde das Wachstumsverhalten der drei Referenzstämme auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen miteinander verglichen (Tab. 24). Dabei entspricht die spezifische Wachstumsrate (vgl. Kap. 2.4.2) der Zunahme der Biomasse pro Zeiteinheit und ist in der exponentiellen Wachstumsphase maximal.

Tab. 24. Spezifische Wachstumsrate μ (h^{-1}) und Verdopplungszeit t (h) der Biomasse der Referenzstämme unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen.

Referenzstamm	PAO1		TBCF10839		PA14	
Kohlenstoffquelle	μ	t	μ	t	μ	t
Trypton	0.85	0.82	0.98	0.71	---	---
Caseinaminosäuren	0.51	1.37	0.47	1.47	0.68	1.02
Glucose	0.69	1.00	0.74	0.93	---	---
Glucose-Methionin	0.96	0.72	1.54	0.45	1.17	0.59
Cadaverin	0.17	4.08	0.15	4.49	---	---
Succinat	0.57	1.22	0.57	1.22	---	---
Citrat	0.62	1.11	0.60	1.20	---	---

Die Analyse der spezifischen Wachstumsrate sowie dadurch bedingt der Verdopplungszeit der Biomasse reflektiert einen hohen Grad an Konformität von PAO1 und TBCF10839 zueinander. Besonders hervorzuheben sind die annähernd gleichen Wachstumsraten von PAO1 und TBCF10839 auf den Kohlenstoffquellen Glucose, Cadaverin, Succinat und Citrat. PA14 weist, verglichen mit PAO1 und TBCF10839, bei Kultivierung auf CasAA eine höhere Wachstumsrate auf, was eine effizientere Adaptation an das offerierte Medium und folglich eine effizientere Metabolisierung der CasAA andeutet. Lediglich das Medium mit Glucose-Methionin als Kohlenstoffquelle stellt eine Ausnahme dar. Es zeigt deutliche Differenzen zwischen den drei Referenzstämmen auf, wobei TBCF10839, verglichen mit PAO1 und PA14, eine signifikant erhöhte Wachstumsrate aufweist.

Obgleich Differenzen zwischen den Referenzstämmen PAO1 und TBCF10839 innerhalb des Wachstumsverhaltens, beispielsweise bei Wachstum auf Glucose-Methionin, detektiert werden konnten, lassen sich Parallelen zu den Korrelationskoeffizienten (Tab. 23) ziehen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit Hilfe elementarer statistischer Instrumente, via PCA (Abb. 42) und HCA (Abb. 43), ohne detaillierte Betrachtung der Metabolitkonzentrationen die Charaktere von Daten und ihre Lokalisation zueinander determiniert werden können. Dabei konnte eine separate Clusterung der Medien mit undefinierter und definierter Kohlenstoffquelle erzielt werden. Des weiteren konnte mittels der Analyse der Korrelationskoeffizienten (Tab. 23) und des Wachstumsverhaltens (Tab. 24) eine approximative Klassifizierung der Referenzstämmen untereinander, in Bezug auf die Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen, bestimmt werden.

3.2.2 Metabolische Profile der Referenzstämme PAO1, TBCF10839 und PA14 bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Um an die grob skizzierenden Ergebnisse der PCA und HCA anschließen zu können, werden die metabolischen Profile der Referenzstämme aus der exponentiellen Wachstumsphase bei Verwendung von verschiedenen Kohlenstoffquellen anhand von Streudiagrammen, die die Varianzen der Referenzstämme untereinander verdeutlichen sollen, visualisiert und im Folgenden beschreiben. Die in diesem Kapitel diskutierten Stoffwechselwege sind im Anhang (Zusatzblatt 1 und 2 für *P. aeruginosa* PAO1) dargestellt.

Unbekannte Substanzen werden in den Streudiagrammen als „Unknown“ bezeichnet. Diese Substanzen sind strukturell nicht identifizierte Komponenten, wurden jedoch wiederholt in den Proben detektiert. Der Übersichtlichkeit halber können nicht alle signifikant veränderten identifizierten Metabolite namentlich gekennzeichnet werden. Durch die Division der auf den Achsen aufgetragenen normierten Peakflächen der Metabolite (Ordinate/Abszisse) resultieren Faktoren. Faktoren mit den Werten > 2 bzw. < 0.5 werden diskutiert und stellen entsprechend einen hoch- bzw. herunterregulierten Metaboliten dar. Diese sind im Anhang (Tab. 49-59; S. 229-234) detaillierter aufgeführt.

Die für die Streudiagramme verwendeten Daten setzen sich jeweils aus zwei (Trypton), vier (Glucose-Methionin) bzw. sechs Replikaten (CasAA, Cadaverin, Glucose, Succinat, Citrat) zusammen, deren gemessene relative Metabolitkonzentrationen gemittelt wurden. Die Proben aller Ansätze wurden im exponentiellen Wachstum geerntet und die Kulturen wiesen zu diesem Entnahmezeitpunkt die höchste spezifische Wachstumsrate auf (Kap. 2.4.2).

Einleitend werden die beiden Medien mit undefinierter Kohlenstoffquelle, anschließend die fünf Medien mit definierter Kohlenstoffquelle beschrieben.

3.2.2.1 Trypton, Caseinaminosäuren

Die Abbildungen 44 und 46 stellen jeweils Streudiagramme der metabolischen Profile von TBCF10839 (Ordinate) und PAO1 (Abszisse) aus dem exponentiellem Wachstum in den Medien mit Trypton (Abb. 44) sowie CasAA (Abb. 46) als Kohlenstoffquelle, im Vergleich dar. Trypton besteht aus Peptiden und CasAA aus einzelnen Aminosäuren. Obgleich Unterschiede in den offerierten Komponenten der Medien vorlagen, konnten bei Verwendung dieser Kohlenstoffquellen nur geringe Unterschiede im metabolischen Profil zwischen den Stämmen TBCF10839 und PAO1 detektiert werden. Diese Aussage wird durch die Korrelationskoeffizienten von 0.988 für Trypton und 0.983 für CasAA verifiziert.

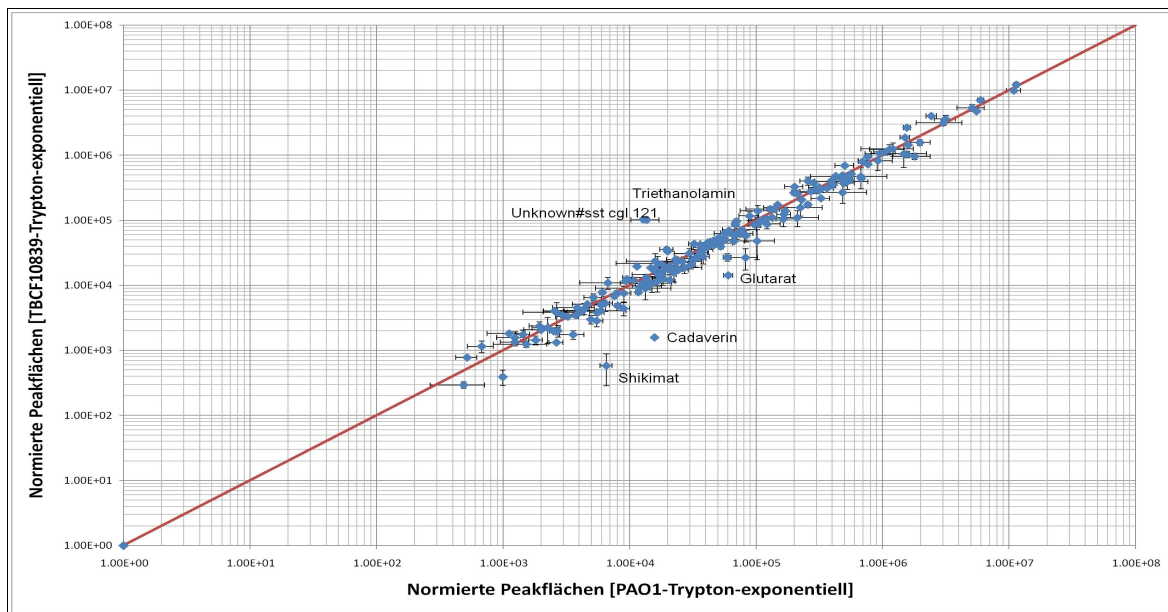


Abb. 44. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit Trypton. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Bei Wachstum auf Trypton konnten lediglich in der exponentiellen Wachstumsphase Unterschiede bei den Metaboliten Triethanolamin, Shikimat, Cadaverin, Glutarat und der unbekannten Substanz Unknown#sst_cgl_121 detektiert werden. Die Faktoren der erhöht und vermindert vorliegenden Metabolite in TBCF10839, verglichen mit PAO1, sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (Tab. 49; S. 229). Cadaverin und Glutarat, beides Intermediate der Lysin-Degradation, weisen bei Wachstum auf Trypton in TBCF10839, verglichen mit PAO1, ein reduziertes Konzentrationslevel auf. Cadaverin, ein Polyamin, ist in der Antibiotika-Resistenz, beim Schutz vor äußerem oxidativem Stress (Jung et al., 2003; Tkachenko et al., 2001), wie Radiation (Kim & Oh, 2000), saurem pH (Samartzidou et al., 2003; Soksawatmaekhin et al., 2004) und anderen toxischen Agentien (Chattopadhyaya et al., 2003; Minton et al., 1990) involviert. Zudem sind Polyamine in der Kontrolle der Membranpermeabilität bei *E. coli* beteiligt, indem die äußeren Membran-Porin-Kanäle (OmpF und OmpC) blockiert werden. Zusätzlich sind Polyamine auch als Modulator in der DNA Replikation, Transkription, Translation sowie der Proteinaktivität in *E. coli* bekannt (Dela Vega & Delcour, 1996).

Shikimat, Intermediat der Aromaten-Biosynthese, liegt ebenfalls in TBCF10839 in verringerten Konzentrationen vor. Dies könnte anhand einer 2005 veröffentlichten Studie von Palmer et al. erklärt werden, die mit Hilfe von Transkriptomdaten zeigte, dass speziell die Aromaten die Biosynthese des *Pseudomonas*-Quinolone-Signal-Systems (PQS), das die Expression der Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* kontrolliert, induzieren.

Ein in der Studie postulierter Stoffwechselweg der aromatischen Aminosäure und Quinolon/Quinolin-Biosynthese ist in Abbildung 45 dargestellt.

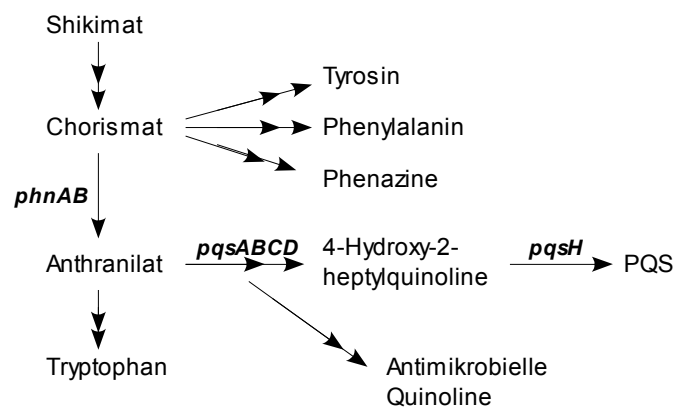


Abb. 45. Vorgeschlagener Stoffwechselweg der aromatischen Aminosäure und Quinolon/Quinolin-Biosynthese in *P. aeruginosa*. Doppelte Pfeilspitzen zeigen mehrere Schritte an. Die für die Quinolon/Quinolin Produktion entscheidenden Gene sind in Fettschrift gezeigt. Modifiziert nach Palmer et al. (2005).

Ferner besagt die Studie (Palmer et al., 2005), dass der Mechanismus der PQS-Induktion möglicherweise eine Folge von Substratkompetition sein könnte, da sowohl die Biosynthese des *Pseudomonas*-Quinolone-Signals als auch die aromatischen Aminosäuren die Vorläufermetabolite Chorismat und Anthranilat aufzeigen. Infolgedessen könnte die Präsenz aromatischer Aminosäuren die Kompetition dieser Substrate reduzieren und gleichzeitig die *Pseudomonas*-Quinolone-Signal-Biosynthese verstärken. Des Weiteren stellt Chorismat, Folgeprodukt von Shikimat in der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Biosynthese, eine Vorstufe der Siderophor-Biosynthese in *P. aeruginosa* dar (Reimann et al., 2001). *P. aeruginosa* produziert zwei Siderophore, namentlich Pyoverdin und Pyochelin, die der hochaffinen Eisen-Aufnahme dienen. In einer Studie von Poole et al. (1996) wurde gezeigt, dass die Pyoverdin-Produktion für die bakterielle Kolonisierung einer Rattenlunge benötigt wird und zudem mit der letalen Virulenz in einem Brandwunden-Maus-Modell korreliert (Mayer et al., 1996). Pyochelin fördert, nach Injektion in den peritonealen Hohlraum einer Maus, das bakterielle Wachstum sowie die Letalität (Cox, 1982).

Der in TBCF10839 signifikant verringerte Shikimat-Pool könnte infolgedessen in direkter Relation mit der verstärkten Induktion des *Pseudomonas*-Quinolone-Signal-Systems oder der Siderophor-Biosynthese stehen, das einen erhöhten Shikimat-Verbrauch in TBCF10839 zur Folge haben könnte.

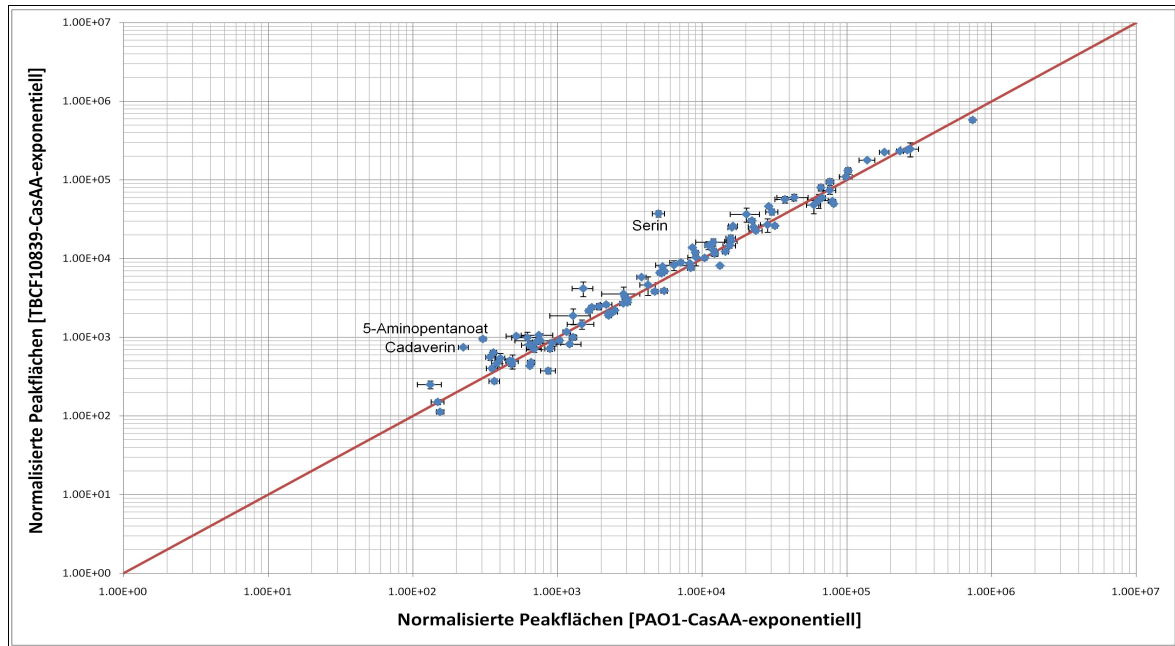


Abb. 46. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit CasAA. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Konträr zu dem Vergleich mit Trypton als Kohlenstoffquelle liegen bei Verwendung von CasAA in TBCF10839, verglichen mit PAO1, die Intermediate der Lysin-Degradation Cadaverin, 5-Aminopentanoat und Glutarat in der exponentiellen Wachstumsphase akkumuliert vor. Ebenfalls zeigt Serin in TBCF10839 erhöhte Konzentrationen. Die Faktoren der erhöht und vermindert vorliegenden Metabolite in TBCF10839, verglichen mit PAO1, sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (Tab. 50; S. 229).

Serin wird, ausgehend von 3-Phosphoglycerat, Intermediat der Glycolyse, mittels Oxidation (SerA, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase [EC 1.1.1.95]), zu 3-Phosphohydroxypyruvat und NADH synthetisiert. Eine reduktive Aminierung des Ketons durch Hydrolyse generiert über Phosphoserin schließlich Serin ([EC 2.6.1.52]; [EC 3.1.33]). Serin Hydroxymethyl-Transferase (GlyA2 [EC 2.1.2.1]) katalysiert die reversible, simultan ablaufende Konvertierung von Serin zu Glycin. Serin agiert in der Biosynthese von Purinen und Pyrimidinen und stellt einen Vorläufermetaboliten einiger Aminosäuren, wie Glycin, Cystein und Tryptophan, dar. Serin ist in phosphorylierter Form bei der Aktivierung von Enzymen beteiligt und kann ferner eine katalytische Funktion in Proteasen übernehmen. Proteasen sind wesentliche Indikatoren in der Gewebeschädigung, die durch *P. aeruginosa* verursacht werden. *P. aeruginosa* sekretiert alkalische Proteasen und die zwei Elastasen A und B, die als Exoenzyme und Virulenzfaktoren charakterisiert wurden (Ohman et al., 1980; Howe & Iglewski, 1984; Kessler et al., 1993). Das Eindringen von

P. aeruginosa in Brandwundenpatienten korreliert mit der Elastaseproduktion (Pavlovskis & Wretling, 1979). Die von *P. aeruginosa* produzierte alkalische Protease und Elastase wird in den Lungen von CF-Patienten generiert und verursacht einen Defekt im Respirationsepithel (Suter, 1994). In *P. aeruginosa* liegen die Proteasen I-IV vor, wobei die Protease IV eine Serinprotease darstellt und deren Aktivität mit einer hohen Virulenz von *P. aeruginosa* korreliert (Engel et al., 1998). Serin könnte infolgedessen als Vorläufermetabolit in TBCF10839 in der exponentiellen Wachstumsphase akkumulieren, um für die über das *Quorum Sensing* (QS)- System gesteuerte Proteasesekretion in der stationären Wachstumsphase in hohen (ausreichenden) Konzentrationen vorzuliegen.

Zudem kann aus Serin via Cystein Methionin generiert werden, das um Faktor 2 erhöht in TBCF10839 vorliegt. Methionin wiederum kann für die Regeneration der Cystein-Biosynthese Sulfat offerieren. Die Präsenz von Sulfat ist essentiell für die Biosynthese der Eisen-Schwefel-Cluster und somit für die Proteinbiosynthese. Eisen-Schwefel-Cluster zählen zu den Cofaktoren zahlreicher Proteine, und ihnen obliegen wesentliche Aufgaben bei dem Elektronentransport, in der Genregulation und der Enzymkatalyse. Andererseits steht Methionin in direktem Zusammenhang mit der Acyl-Homoserinlactone (AHL) Biosynthese (Heurlier et al., 2006). Acyl-Homoserinlactone sind Signalmoleküle im QS, die die Produktion von Virulenzfaktoren und die Biofilmbildung Zelldichte-abhängig regulieren (Venturi, 2006).

Nachfolgend wird der Vergleich mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der exponentiellen Wachstumsphase von PA14 (Ordinate) mit PAO1 (Abszisse) und TBCF10839 (Abszisse) mit CasAA als Kohlenstoffquelle angestellt und anhand von Streudiagrammen (Abb. 47, 48) diskutiert. Die Faktoren der erhöht und vermindert vorliegenden Metabolite in PA14, verglichen mit PAO1 und TBCF10839, sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (Tab. 51-52; S. 229-231).

Die Darstellung der Streudiagramme in Abbildung 47 und 48 reflektiert deutliche Unterschiede von PA14 mit PAO1 (Abb. 47) und TBCF10839 (Abb. 48) bei Wachstum auf dem undefinierten Medium mit CasAA als Kohlenstoffquelle in der exponentiellen Wachstumsphase. Dies kann anhand der kalkulierten Korrelationskoeffizienten von 0.913 für den Vergleich von PA14 mit PAO1 sowie von 0.907 für PA14 mit TBCF10839 verifiziert werden.

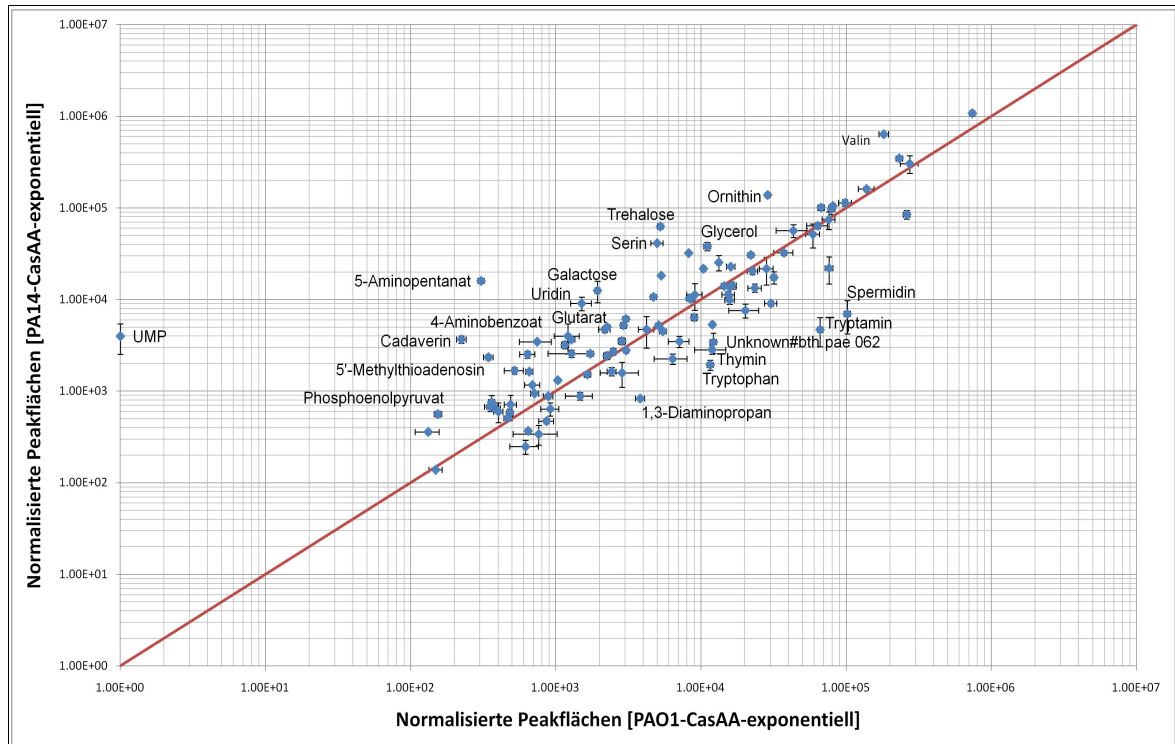


Abb. 47. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA14, verglichen mit PA01, bei exponentiellem Wachstum mit CasAA. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

PA14 weist eine annähernd äquivalente Korrelation zu PA01 und TBCF10839 auf, was wiederum am nahezu identischen metabolischen Profil von PA14 zu beiden Referenzstämmen verdeutlicht wird. Intermediate des Zitronensäurezyklus (Malat, Succinat), der Vorläufer Pyruvat, des Pyrimidin-Metabolismus (Uridin, Uridin-5-monophosphat (UMP)), Zucker (Galactose, Trehalose) sowie Zuckerphosphate (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat), Serin, 5'-Methylthioadenosin, Ornithin und Intermediate der Lysin-Degradation liegen in PA14, verglichen mit PA01 und TBCF10839, in erhöhten Konzentrationen vor. Das deutet auf eine erhöhte Energieeffizienz von PA14 hin, die mit der erhöhten spezifischen Wachstumsrate (Tab. 24) begründet werden kann. Die effiziente Energiebilanz von PA14 kann mit den erhöhten Konzentrationen von Glucose-6-phosphat sowie Fructose-6-phosphat erklärt werden kann, da für die Biosynthese ATP verbraucht wird. Liegt ein geringer ATP-Gehalt in der Zelle vor, verlagert sich das Gleichgewicht in Richtung unphosphorylierter Verbindungen, und Glucose-6-phosphat sowie Fructose-6-phosphat können nur in sehr geringen Konzentrationen gebildet werden.

Die in PA14 in reduzierten Konzentrationen detektierten Metabolite Glycerol und Trehalose könnten einerseits als Speicherstoffe infolge des breiten Spektrums an offerierten Nahrungsquellen (Aminosäuren), andererseits als Osmolyten aufgrund des

exponentiellen Wachstums und der dadurch bedingten Limitierung des Sauerstoffgehaltes im Medium fungieren. Bereits 1982 wurde in der Studie von Yancey et al. erwähnt, dass die Adaptation an hohe Osmolaritäten oder an Stresssituationen mit der intrazellulären Akkumulation organischer Komponenten (Osmolyten), wie Polyole (Zucker, Glycerol), Aminosäuren (Proline, Glutamat), Aminosäure-Derivate (Glycin-Betain, Gamma-Aminobutyrat), Peptide, Methylamine und Urea (Harnstoff), einhergeht (Measures, 1975; Yancey et al., 1982, Diab et al., 2006).

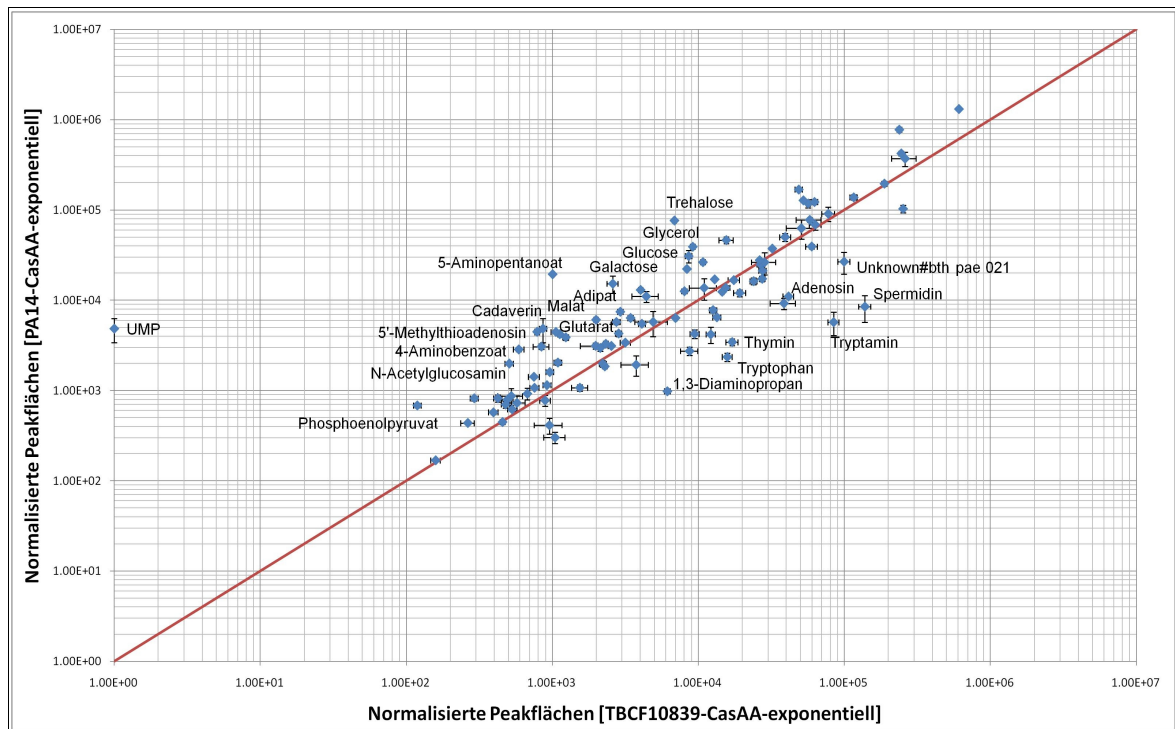


Abb. 48. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA14, verglichen mit TBCF10839, bei exponentiellem Wachstum mit CasAA. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >4.

Die Intermediate der Lysin-Degradation, 5'-Methylthioadenosin sowie Serin könnten in Relation mit einer auf CasAA-Medium schwächer ausgeprägten Pathogenität von PAO1 und TBCF10839, verglichen mit PA14, stehen. Infolge der Konvertierung von S-Adenosylmethionin in 5'-Methylthioadenosin resultieren 3O-C₁₂-HSL und C₄-HSL und stellen demnach die Basis des AHL-Metabolismus sowie des Cystein- und Methionin-Metabolismus in *P. aeruginosa* dar (Heulier et al., 2006).

Über die Decarboxylierung von S-Adenosylmethionin mittels der S-Adenosylmethionin Decarboxylase (SpeD [EC 4.1.1.50]) sowie Spermin-Synthase (SpeE [EC 2.5.1.16]) erfolgt einerseits die bereits erwähnte Synthese von 5'-Methylthioadenosin und andererseits die von Spermidin. Verifiziert werden kann dies anhand der in PA14,

verglichen mit PAO1 und TBCF10839, verstärkt detektierten Konzentration von 5'-Methylthioadenosin und mit den verminderten Konzentrationen von Spermidin und dessen Folgeprodukt 1,3-Diaminopropan, das über die Spermidin Dehydrogenase (SpdH [EC 1.5.99.6]) generiert wird.

Die verminderte Konzentration der aromatischen Aminosäure Tryptophan und dem Folgeprodukt Tryptamin könnte in PAO1 und TBCF10839, verglichen mit PA14, mit dem in der Aromaten-Biosynthese involvierten *Pseudomonas*-Quinolone-Signal-System sowie der Siderophor-Biosynthese zusammenhängen (vgl. Abb. 45).

Infolgedessen könnte PA14, verglichen mit PAO1 sowie TBCF10839, eine erhöhte Virulenz auf dem CasAA-Medium aufweisen, das in Relation mit der effizienteren Adaptation an Aminosäure-angereicherte Medien, beispielsweise dem Mucus der Lunge, stehen könnte.

Im Folgenden wird detaillierter auf den Vergleich der metabolischen Profile der Referenzstämme auf den unterschiedlichen Medien mit definierter Kohlenstoffquelle, beginnend mit der Kohlenstoffquelle Cadaverin, der sich Glucose, Glucose-Methionin, Citrat sowie Succinat anschließen, eingegangen, und die Analogien sowie Differenzen werden anhand von Streudiagrammen dargestellt.

3.2.2.2 Cadaverin

Cadaverin als alleinige Kohlenstoffquelle im Medium stellt infolge sehr geringer Wachstumsraten von 0.15h^{-1} (PAO1) und 0.17h^{-1} (TBCF10839) eine nicht präferierte Kohlenstoffquelle für *P. aeruginosa* dar. In Abbildung 49 (Tab. 53; S. 231) wird der Vergleich von TBCF10839 zu PAO1 in der exponentiellen Wachstumsphase auf Cadaverin visualisiert. TBCF10839 wird auf der Ordinate und PAO1 auf der Abszisse dargestellt. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen beträgt für TBCF10839 19% und für PAO1 21%. Die Korrelation von TBCF10839 zu PAO1 auf Cadaverin entspricht einem Wert von 0.993.

Lediglich die unbekannte, strukturell nicht identifizierte Substanz Unknown#bth_pae_051 liegt in TBCF10839, verglichen mit PAO1, im exponentiellen Wachstum erhöht vor (Abb. 49) und bestätigt die hohe Korrelation von annähernd 1. Dies weist darauf hin, dass beide Referenzstämme einen äquivalenten Katabolismus von Cadaverin aufzeigen.

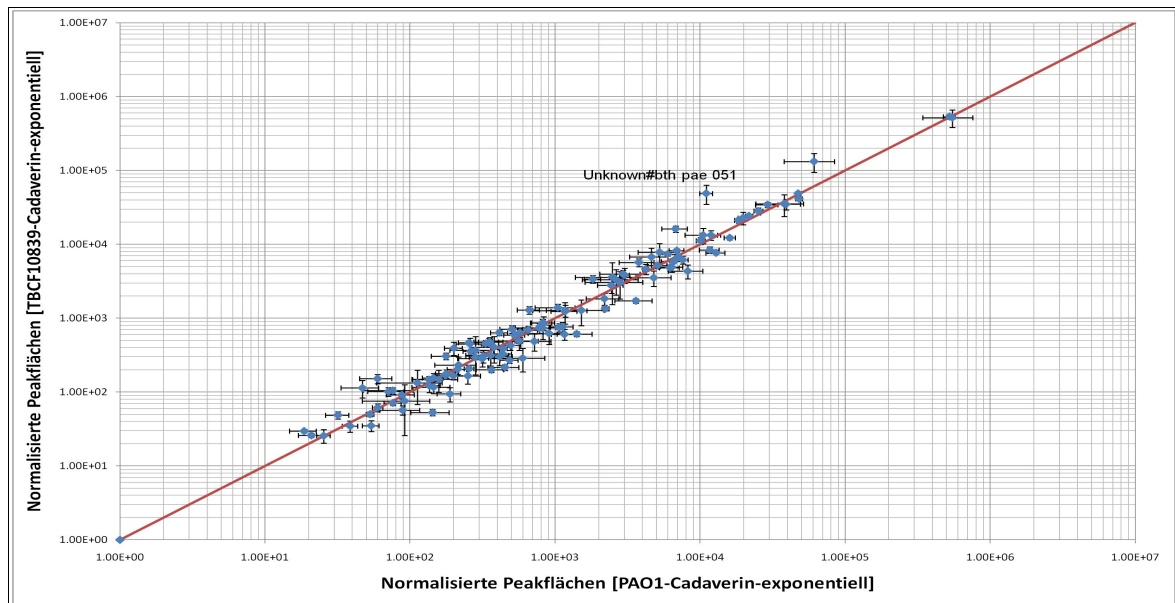


Abb. 49. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit Cadaverin. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >4.

Der Eintritt dieser nicht präferierten Kohlenstoffquelle in den Metabolismus von *P. aeruginosa* erfolgt auf der Ebene der Lysin-Degradation. Wurden die metabolischen Profile von TBCF10839 und PAO1 in der exponentiellen Wachstumsphase auf Cadaverin als Kohlenstoffquelle im einzelnen betrachtet, konnten die Katabolite von Cadaverin, beispielsweise Glutarat und Zitronensäurezyklus-Intermediate, infolge der Konvertierung von Glutarat zu Acetyl-CoA, detektiert werden. So ist *P. aeruginosa* bei Wachstum auf Cadaverin in der Lage, die Energie für die Proteinbiosynthese über Acetyl-CoA und den Zitronensäurezyklus oder den Fettsäure-Metabolismus zu gewinnen.

Der Vorläufermetabolit von Cadaverin, Lysin, konnte unter Verwendung dieser Kohlenstoffquelle weder in der exponentiellen noch in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden. Das Enzym Lysin-Decarboxylase [EC 4.1.1.18], das die Decarboxylierung von Cadaverin in *P. aeruginosa* katalysiert, liegt laut KEGG und BRENDA bislang noch nicht annotiert vor. Allerdings wurde in der Studie von Fothergill und Guest (1977) anhand von Mutanten und unterschiedlicher Wachstumsmedien der Katabolismus von Lysin zu Cadaverin analysiert und identifiziert. Im Weiteren wurde in der Studie von Thielen (2007) anhand einer Deletionsmutante die Lysin-Decarboxylase identifiziert. Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass bei Wachstum auf Cadaverin als alleinige Kohlenstoffquelle im Medium das Enzym Lysin-Decarboxylase [EC 4.1.1.18] nur unidirektional agiert und dementsprechend aus Cadaverin kein Lysin generiert werden kann.

3.2.2.3 Glucose

Der Katabolismus von Glucose in *P. aeruginosa* erfolgt über den Entner-Doudoroff-Weg und ist in Kapitel 1.5 detailliert beschrieben. Im Folgenden wird der Vergleich der metabolischen Profile von TBCF10839 zu PAO1 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose als Kohlenstoffquelle anhand eines Streudiagramms in Abbildung 50 dargestellt und analysiert. Dabei wird TBCF10839 auf der Ordinate und PAO1 auf der Abszisse abgebildet. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen beträgt für TBCF10839 14% und für PAO1 12%. Die Faktoren der erhöht und vermindert vorliegenden Metabolite in TBCF10839 verglichen mit PAO1 sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (Tab. 54; S. 231).

Die Analyse des in Abbildung 50 dargestellten Vergleichs von TBCF10839 und PAO1 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle zeigt deutliche Unterschiede in dem metabolischen Verhalten der beiden Referenzstämme zueinander auf. Die kalkulierte Korrelation von TBCF10839 zu PAO1 beträgt 0.89 und reflektiert die hohe Varianz in den metabolischen Profilen der beiden Referenzstämme.

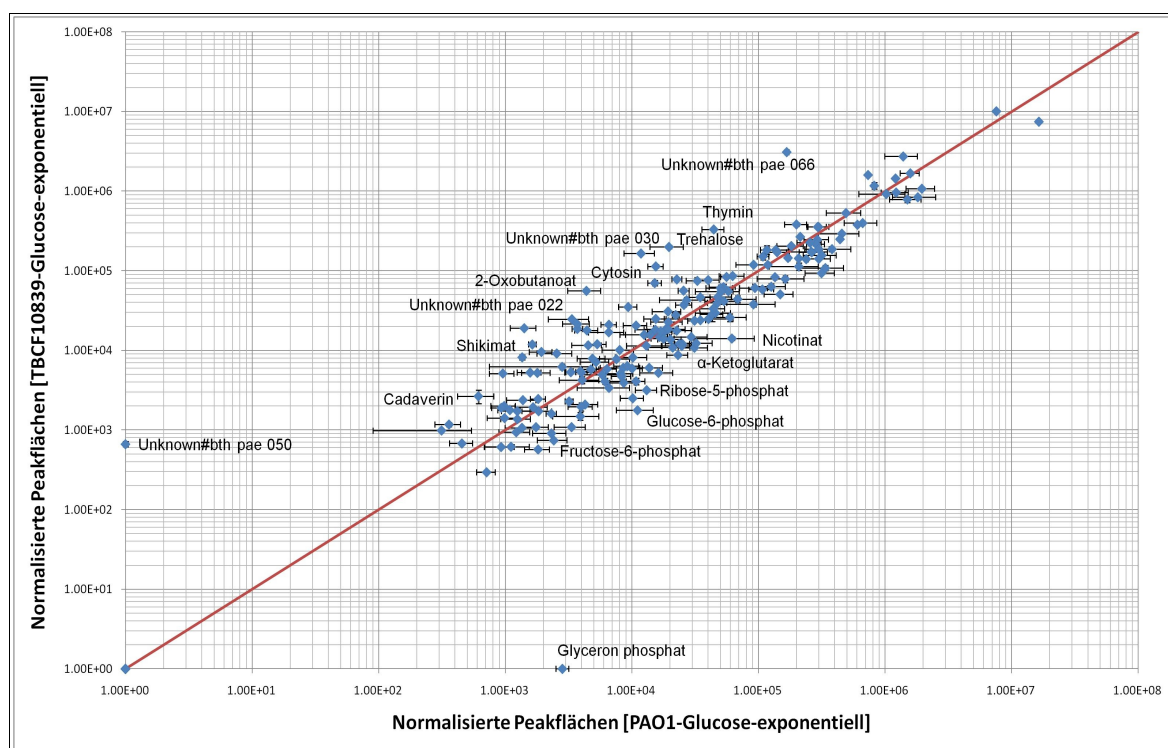


Abb. 50. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit Glucose. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Infolge der in TBCF10839, verglichen mit PAO1, in verringerten Konzentrationen vorliegenden glycolytischen Zuckerphosphate (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Ribose-5-phosphat), der Zitronensäurezyklus-Intermediate (α -Ketoglutarat, Malat) und von Nicotinat könnte auf eine reduzierte Energieeffizienz von TBCF10839 geschlossen werden (vgl. Kap. 3.2.2.1).

Im Gegensatz dazu liegen der Speicherstoff Trehalose, die Intermediate der Lysin-Degradation (Cadaverin) und des Pyrimidin Metabolismus (Thymin, Cytosin) und Shikimat in verstärkten Konzentrationen in TBCF10839, verglichen mit PAO1, vor. Die Akkumulation von Shikimat, eine Vorstufe von Chorismat und folglich der Aromaten sowie *Pseudomonas*-Quinolone-Signal-Biosynthese (vgl. Abb. 45), könnte in direkter Relation mit einer erhöhten Virulenz von TBCF10839 stehen.

Des weiteren könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass Cadaverin nicht nur ein Polyamin darstellt, sondern mit einer erhöhten Virulenz eines Organismus gleichzusetzen ist. Begründet werden könnte diese Hypothese anhand der in den Abbildungen 46-48 und 50 dargestellten Vergleiche der Referenzstämme bei Wachstum auf CasAA und Glucose. In den Analysen der metabolischen Profile bei exponentiellem Wachstum auf CasAA (Abb. 47) liegt Cadaverin in PA14, verglichen mit PAO1, um den Faktor 23.53 und, verglichen mit TBCF10839 (Abb. 48), um den Faktor 6.69 erhöht vor. Ferner zeigt der Vergleich metabolischer Profile bei Wachstum auf Glucose (Abb. 50) eine erhöhte Konzentration von Cadaverin (Faktor 4.33) in TBCF10839, verglichen mit PAO1. Die signifikante Akkumulation von Cadaverin korreliert mit dem jeweiligen virulenteren Referenzstamm. Daher könnte angenommen werden, dass Cadaverin ein möglicher Indikator für den Grad der Virulenz von *P. aeruginosa* darstellt.

3.2.2.4 Glucose-Methionin

Abbildung 51 zeigt den Vergleich von TBCF10839 zu PAO1 in der exponentiellen Wachstumsphase auf Glucose-Medium mit der zusätzlichen Kohlenstoffquelle Methionin. TBCF10839 wird auf der Ordinate und PAO1 auf der Abszisse abgebildet. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen auf dem Glucose-Methionin-Medium beträgt bei PAO1 15.1% und bei TBCF10839 12.4%.

Die Faktoren der erhöht und vermindert vorliegenden Metabolite in TBCF10839, verglichen mit PAO1 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose-Methionin, sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (Tab. 55; S. 232).

Die Gegenüberstellung metabolischer Profile von TBCF10839 und PAO1 (Abb. 51) bei exponentiellem Wachstum auf Glucose-Methionin beschreiben ein konträres Bild zu der in Abbildung 50 gezeigten Glucose-Kultivierung.

Die kalkulierte Korrelation von TBCF10839 und PAO1 weist einen Wert von 0.979 auf und folglich eine um 0.089 höhere Korrelation als auf dem Medium mit alleiniger Glucose. Zusätzlich kann eine zweifache Steigerung der spezifischen Wachstumsrate bei TBCF10839 auf Glucose-Methionin-Medium, verglichen mit dem Glucose-Medium, festgestellt werden. PAO1 weist lediglich einen Zuwachs der spezifischen Wachstumsrate von einem Drittel auf (Tab. 24).

Die deutliche Steigerung der Wachstumsrate könnte mit einem infolge der Methionin-Zugabe erwirkten diauxischen Wachstum einhergehen. Begründet werden könnte diese Hypothese der Diauxie mit der effizienteren Adaptation von *P. aeruginosa* an Aminosäure-reiche Medien, beispielsweise der Mucus von Cystische Fibrose-Lungen, der einen hohen Grad an Aminosäuren aufweist und die Präferenz von *P. aeruginosa* Zitronensäurezyklus-Intermediate vor der Kohlenstoffquelle Glucose zu verwerten (Lessie & Phibbs, 1984). Vermutet wird daher, dass *P. aeruginosa* Aminosäuren anstelle von Glucose bevorzugt, was allerdings noch mit Messungen des Überstands der Kulturen belegt werden müsste.

Während eines diauxischen Wachstums könnte Methionin infolgedessen die präferierte Kohlenstoffquelle darstellen, die initial katabolisiert wird. Methionin wird mittels eines ABC-Transporters ($ABC = \text{ATP-binding cassette}$) und unter Beteiligung der Proteine MetQ, MetI sowie MetN in die *Pseudomonas*-Zelle importiert und anschließend möglicherweise mittels des Enzyms S-Adenosylmethionin-Synthetase (MetK [EC 2.5.1.6]) zu S-Adenosylmethionin konvertiert, was die Basis des AHL-Metabolismus widerspiegelt. Des weiteren könnte Methionin in der Zelle das fehlende Sulfat für die Eisen-Schwefel-Cluster generieren, um die für die Proteinbiosynthese benötigten Cofaktoren zu stellen.

Glucose wird – möglicherweise erst nach vollständiger Konsumierung von Methionin – in die Zellen importiert, über den Entner-Doudoroff-Weg zu Glyceraldehyd-3-Phosphat und Pyruvat konvertiert (vgl. Kap. 1.5) und liefert im Anschluss über den Zitronensäurezyklus unter anderem Reduktionsäquivalente, die der Energiegewinnung dienen.

Obwohl das Wachstumsverhalten beider Wildtypstämme differiert, reflektiert ihr Metabolitkonzentrationsvergleich eine hohe Analogie zueinander. Lediglich Hypoxanthin (Nukleotid-Metabolismus), Ornithin und Intermediate der Aromaten Biosynthese (Shikimat, Phenylalanin, Phenylpyruvat, Tyrosin) akkumulieren in TBCF10839, verglichen mit PAO1 (Abb. 51).

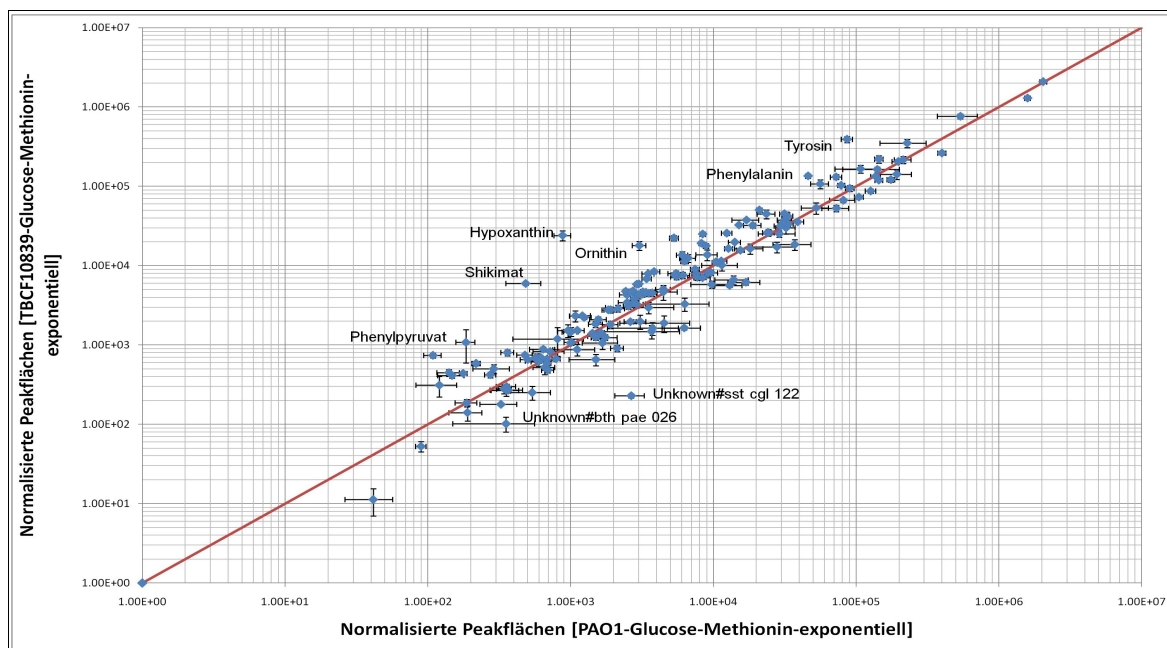


Abb. 51. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit Glucose-Methionin. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Dieses metabolische Profil von TBCF10839, verglichen mit PAO1, könnte eine effizientere Aromaten-Biosynthese und folglich eine erhöhte Aminosäure-Biosynthese reflektieren. Aminosäuren stellen die Grundbausteine von Peptiden und Proteinen dar. Werden diese oder die Vorläufer in einem hohem Grad synthetisiert, erfolgt eine verstärkte Proteinbiosynthese, was ein schnelleres Wachstum der Zellen ermöglicht. Diese Vermutung wird gestützt durch die signifikant erhöhte Wachstumsrate von TBCF10839 ($\mu = 1.54\text{h}^{-1}$), verglichen mit PAO1 ($\mu = 0.96\text{h}^{-1}$) (Tab. 23).

Die Analyse der metabolischen Profile von TBCF10839 und PAO1 während des exponentiellen Wachstums auf Glucose-Methionin (Abb. 51) reflektiert ein entgegengesetztes Bild zu der Kultivierung auf Glucose (Abb. 50). Im direkten Vergleich der Metabolitdaten beider Kohlenstoffquellen konnten signifikante Differenzen in der Lysin-Degradation determiniert werden. Unter Methionin-Zugabe verringert sich der Metabolitpool von Lysin um das 4- (PAO1) bzw. 6-fache (TBCF10839), Cadaverin und 5-Aminopentanoat liegen unter der Detektionsgrenze bzw. weisen einen gänzlich erschöpften Metabolitpool auf. Glutarat zeigt eine Reduktion um das 8- (PAO1) bzw. 9-fache (TBCF10839). Außerdem verringern sich die Konzentrationen von 5'-Methylthioadenosin um den Faktor 7 (PAO1) bzw. 3 (TBCF10839) sowie die von Homoserin um den Faktor 4 (PAO1) bzw. 3 (TBCF10839). Die Verminderung dieser Metabolitkonzentrationen könnte möglicherweise

in Relation mit dem diauxischen Wachstum sowie mit den dadurch bedingten Variationen im Katabolismus der Kohlenstoffquellen, stehen.

Im Anschluss erfolgt eine Gegenüberstellung der metabolischen Profile von PA14 mit denen von PAO1 in Abbildung 52 und mit denen von TBCF10839 in Abbildung 53 bei exponentiellem Wachstum auf dem Glucose-Methionin-Medium anhand von Streudiagrammen. Dabei wird PA14 jeweils auf der Ordinate, PAO1 und TBCF10839 auf der Abszisse abgebildet. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen auf dem Glucose-Methionin-Medium beträgt bei PA14 16.9%. Die Faktoren der erhöht und vermindert vorliegenden Metabolite in PA14, verglichen mit PAO1 und TBCF10839 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose-Methionin, sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (Tab. 56-57; S. 232-233).

Die Korrelation von PA14 zu PAO1 weist einen Wert von 0.988 und zu TBCF10839 einen Wert von 0.967 (Tab. 19) auf. Die annähernd äquivalente Korrelation von PA14 zu PAO1 und TBCF10839 wird wiederum am ähnlichen metabolischen Profil von PA14 zu beiden Referenzstämmen reflektiert.

Erhöhte Konzentrationen des Fettsäure-Metabolismus (Glycerol, 1- und 2-Monooleoylglycerol, 1-Monostearoylglycerol, 1-Monopalmitoylglycerol, Dodecanoat, Octadecanoat, Hexadecanoat, Palmitat amid, Oleat amid), Glucosamin-6-phosphat sowie 5-Aminolevulinat konnten in PA14, verglichen mit PAO1 und TBCF10839, detektiert werden. 5-Aminolevulinat stellt die Vorstufe der Tetrapyrrole, zu denen die proteingebundene prosthetische Gruppe Häm zählt, dar. Häme stellen essentiellen Cofaktoren von Proteinen dar, die in aeroben und anaeroben Atmungsprozessen (Atmungskettenphosphorylierung) assoziiert vorliegen und dienen der zellulären Energiegewinnung. Eine Akkumulation der Häm-Biosynthese korreliert folglich mit einer effizienten Energiebilanz und möglicherweise mit einem schnelleren Wachstum.

Die verstärkt vorliegenden Konzentrationen des Fettsäure-Metabolismus in PA14, verglichen mit PAO1 und TBCF10839, deuten eine erhöhte Produktion der Membranlipide an, die für die Generierung neuer Zellen im exponentielle Wachstum essentiell sind. Zusätzlich weisen aromatische Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin) sowie deren Precursor Phenylpyruvat in PA14 reduzierte Konzentrationen im Vergleich zu PAO1 und zu TBCF10839 auf. Der Vorläufer von Chorismat Shikimat liegt hingegen in PA14 in erhöhten Konzentrationen vor. Dies könnte auf eine erhöhte PQS- sowie Siderophor-Biosynthese von PA14 und auf eine erhöhte Virulenz hinweisen (vgl. Kap. 3.2.2.1, Abb. 45), was allerdings mit Virulenzstudien an Mäusen oder Nematoden zu beweisen wäre.

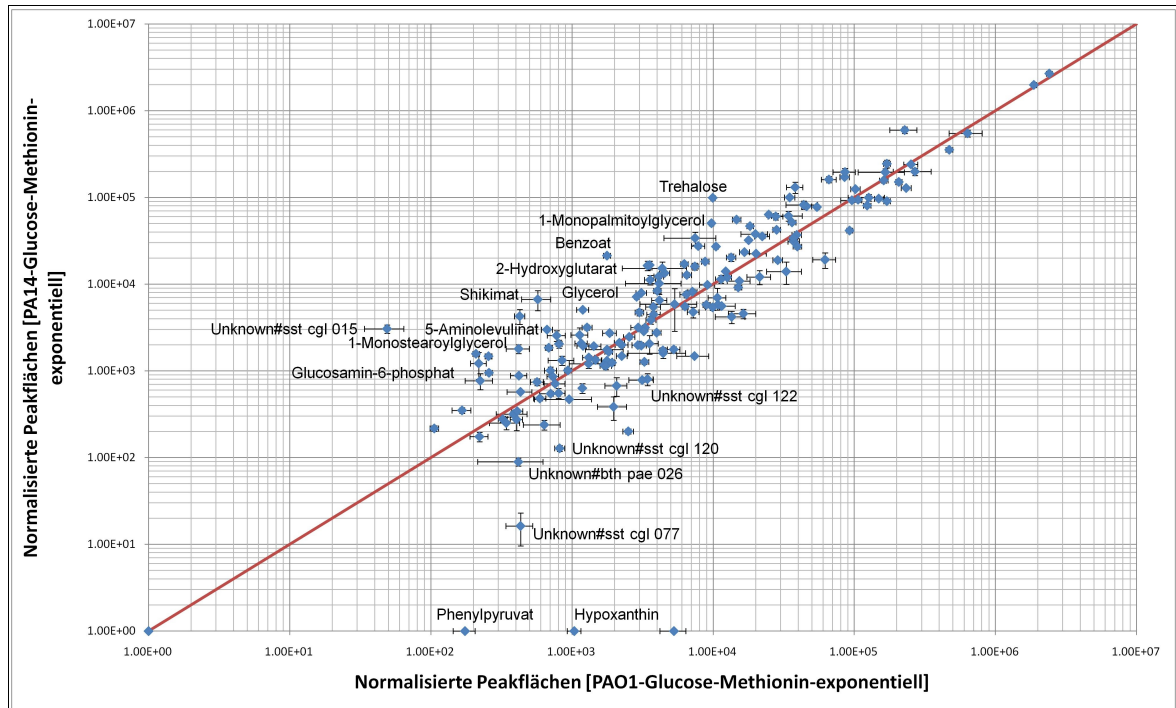


Abb. 52. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA14, verglichen mit PA01 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose-Methionin. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

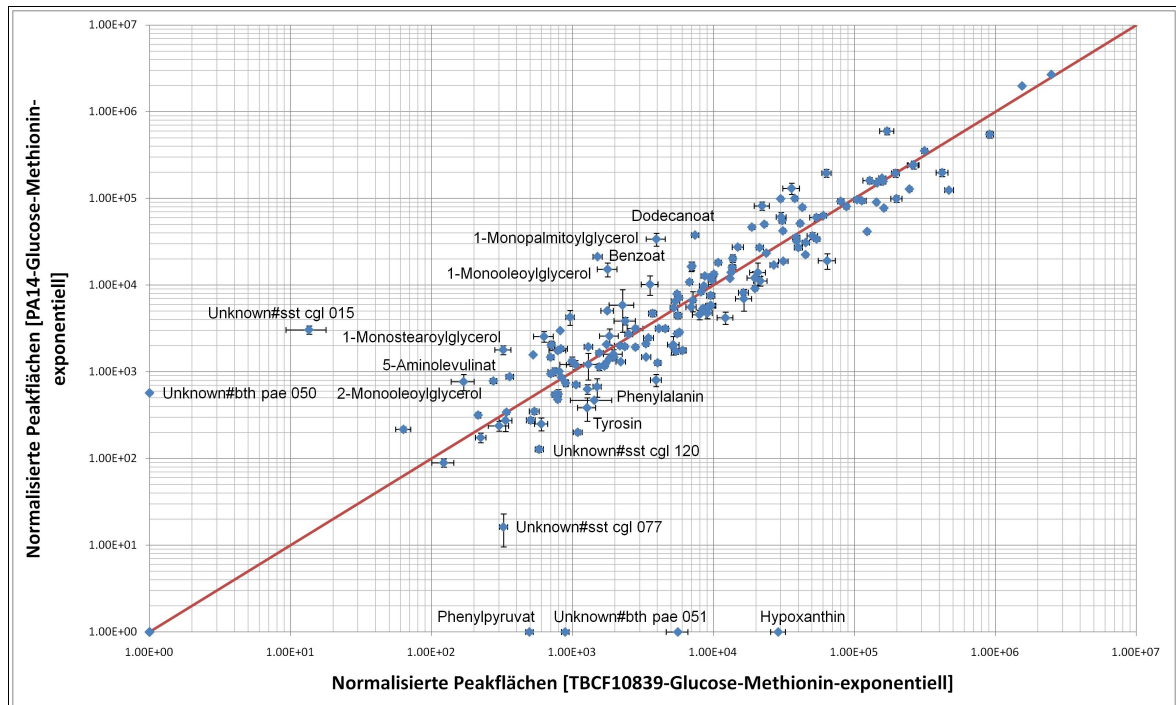


Abb. 53. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA14, verglichen mit TBCF10839 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose-Methionin. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

3.2.2.5 Citrat

Die Analyse der metabolischen Profile von TBCF10839 und PAO1 auf Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle in der exponentiellen Wachstumsphase wird im Folgenden visualisiert (Abb. 54; Tab. 58; S. 233-234), in der TBCF10839 auf der Ordinate und PAO1 auf der Abszisse dargestellt werden. Für den Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen TBCF10839 und PAO1 wird ein hoher Wert von 0.988 kalkuliert (Tab. 20). Die hohe Korrelation steht in Relation mit den wenigen Unterschieden in der Gegenüberstellung der metabolischen Profile der Referenzstämme (Abb. 54). Zudem weisen beide Wildtypstämme eine annähernd äquivalente spezifische Wachstumsrate von $\mu=0.60\text{h}^{-1}$ (TBCF10839) und $\mu=0.62\text{h}^{-1}$ (PAO1) auf. Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen beträgt bei PAO1 11.1% sowie bei TBCF10839 8.3%.

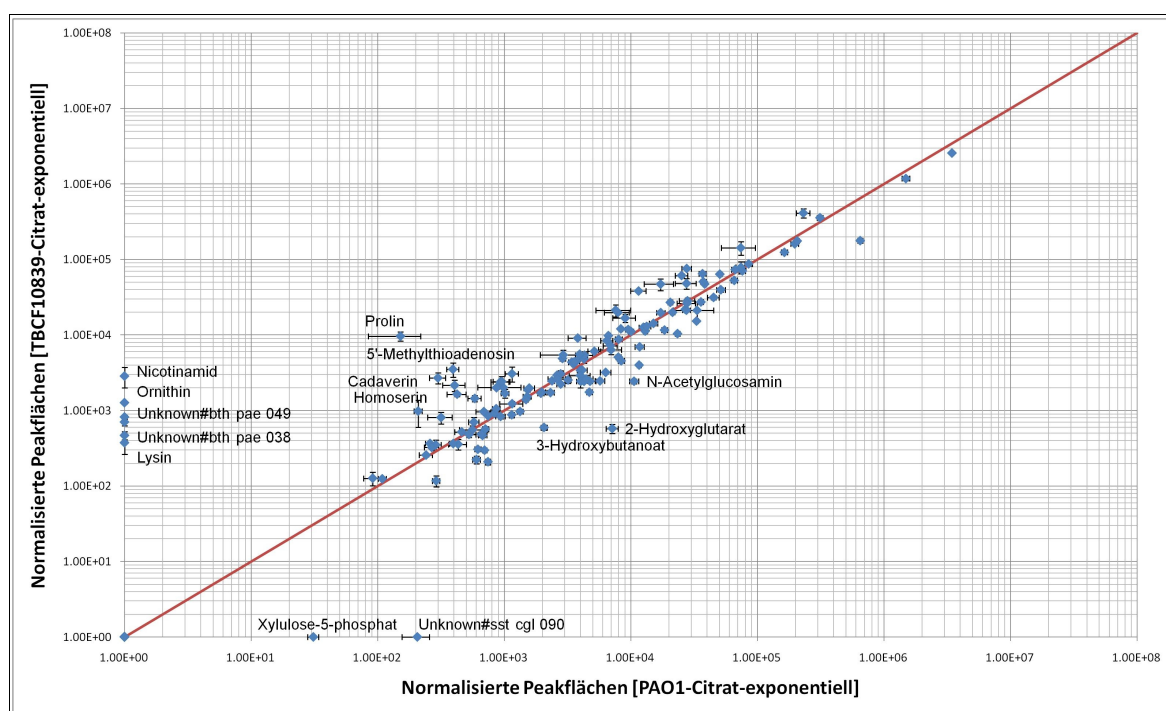


Abb. 54. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1 auf Citrat in der exponentiellen Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Unterschiede zwischen TBCF10839 und PAO1 ergeben sich im Hinblick auf die Lysin-Degradation (Lysin, Cadaverin), dem Arginin und Prolin Metabolismus (Ornithin, Prolin), dem Cystein- und Methionin-Metabolismus (Homoserin, 5'-Methylthioadenosin), der den AHL-Metabolismus involviert, dem Propanoat Metabolismus (2-Hydroxybutanoat, 2-Oxo-butanoat), der Synthese und Degradation von Ketonkörpern (3-Hydroxybutyrat) sowie von 2-Hydroxyglutarat und Nicotinamid.

Die Akkumulation der Intermediate der Lysin-Degradation und des Cystein- und Methionin-Metabolismus in TBCF10839, verglichen mit PAO1, könnte in direkten Bezug zu einer erhöhten Virulenz von TBCF10839 gesetzt werden. In TBCF10839, verglichen mit PAO1, liegt das kompatible Solut Prolin und die Vorstufe Ornithin in erhöhten Konzentrationen vor. Dies deutet auf eine Stresskompensation der Zellen hin (Rößler & Müller, 2001), die durch eine Limitierung der Sauerstoffkonzentration im Medium während des exponentiellen Wachstums aufgrund des verstärkten Sauerstoffbedarfs hervorgerufen wurde. Zudem reflektiert das metabolische Profil von TBCF10839, verglichen mit dem von PAO1, einen möglichen Nachteil in der Energieeffizienz infolge der reduziert vorliegenden katabolischen Intermediate wie 2-Hydroxybutanoat, 2-Oxobutanoat, 3-Hydroxybutyrat und 2-Hydroxyglutarat. Aus Acetyl-CoA, das binnen einer Citrat-Kultivierung und infolgedessen eines stärker induzierten Fettsäure-Metabolismus im Überangebot vorliegt, können Ketonkörper wie Acetoacetat und 3-Hydroxybutyrat entstehen. Über Acetyl-CoA kann mittels zweier aufeinander folgender reversibler Transferasereaktionen Acetoacetyl-CoA (Acetyl-CoA Acetyltransferase [EC 2.3.1.9]) sowie Acetoacetat (DhcA, Dehydrocarnitin-CoA Transferase [EC 2.8.3.5]) generiert werden. Die anschließende ebenfalls reversible Reduktion von Acetoacetat zu 3-Hydroxybutanoat erfolgt via 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (BdhA [EC 1.1.1.30]) unter Verwendung des Coenzym NADH + H⁺ und wurde in einer Studie von Paithankar et al. (2007) in *P. putida* analysiert. Die beschriebene Synthese und Degradation von Ketonkörpern ist für den Stamm PAO1 bereits annotiert.

Für die Konvertierung via Oxidation unter Verwendung des Coenzym NAD⁺ von 2-Hydroxybutanoat zu 2-Oxobutanoat wurde laut KEGG noch kein Enzym für *P. aeruginosa* annotiert. Anhand von *E. coli* Genom-Daten konnte in der Studie von Yin und Kirsch (2007) das unter anderem die beschriebene Reaktion umsetzende Enzym Lactat-Dehydrogenase ([EC 1.1.1.27]) (in *E. coli*) näher charakterisiert werden. Die Lactat-Dehydrogenase unterscheidet sich lediglich in fünf Positionen von der *E. coli* Malat Dehydrogenase ([EC 1.1.1.37]) Sequenz. Auf Grund der Studie und der Akkumulation von 2-Hydroxybutanoat und 2-Oxobutanoat, die zwei Intermediate des Propanoat Metabolismus reflektieren, könnte die Lactat-Dehydrogenase ebenfalls in *P. aeruginosa* existieren. Anschließend könnte 2-Oxobutanoat via Phosphorylierung zu Propanoylphosphat umgesetzt werden, das über eine Transferase-Reaktion durch das Enzym Phosphat Acetyltransferase (Pta [EC 2.3.1.8]) zu Propanoyl-CoA konvertiert. Letzteres kondensiert mit Glyoxylat sowie Wasser unter CoA-Abspaltung zum Produkt 2-Hydroxyglutarat, Intermediat des *C5-Branched dibasic acid metabolism*, das ebenfalls in PAO1, verglichen mit TBCF10839, akkumuliert vorliegt. Sowohl der Propanoat Metabolismus als auch der *C5-Branched*

dibasic acid metabolism sind im Kohlenhydrat-Metabolismus integriert und könnten die These der effizienten Energiebilanz von PAO1, verglichen mit TBCF10839, unterstützen.

Ferner kann bei der Betrachtung einzelner Metabolite von PAO1 und TBCF10839 (Abb. 55) gezeigt werden, dass der Glyoxylat-Weg - Komponente des Zitronensäurezyklus - in beiden Referenzstämmen induziert wird. In einer Studie von Saz und Hillary (1956) wurde bereits erwähnt, dass getrocknete Zellen sowie zellfreie Extrakte von *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* in der Lage sind, Glyoxylat und Succinat aus Citrat, cis-Aconitat oder Isocitrat zu generieren.

Der Glyoxylat-Weg dient der Konvertierung von Acetyl-CoA zu Malat und ferner über die nachgeschaltete Gluconeogenese dem Anabolismus von Kohlenhydraten. Ist der Glyoxylat-Weg aktiv, wird die oxidative Decarboxylierung der Isocitrat-Dehydrogenase (Icd, Idh [EC 1.1.1.42]) und des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes vermieden. Daher werden die Enzyme des Glyoxylat-Wegs im wesentlichen bei einer effizienten Energiebilanz, allerdings bei Kohlenhydratmangel, aktiviert. Überwiegt in den Zellen eines Organismus ein Energiemangel, werden die Enzyme des Zitronensäurezyklus, aufgrund der aus diesem Zyklus und der nachgeschalteten Atmungskettenphosphorylierung resultierenden Reduktionsäquivalenten, verstärkt induziert.

Bei der Konvertierung der eingesetzten Kohlenstoffquelle Citrat wird mittels der Citrat-Synthase (GltA [EC 2.3.3.1]) und CoA Acetyl-CoA, Wasser und Oxaloacetat generiert. Acetyl-CoA kann folgend der Fettsäurebiosynthese, dem Glyoxylat-Weg oder bei signifikantem Überschuss der Synthese und Degradation von Ketonkörpern zugeführt werden. Ferner wird Citrat mittels der Aconitat-Hydratase (AcnAB [EC 4.2.1.3]) zu Isocitrat, das von der Isocitrat-Lyase (AceA [EC 4.1.3.1]), einem Schlüsselenzym des Glyoxylat-Wegs, zu Succinat und Glyoxylat gespalten. Zusätzlich kann unter Abspaltung von CoA und der Zufuhr von Wasser aus Acetyl-CoA und Glyoxylat via der Malat-Synthase (GlcB [EC 2.3.3.9]), dem zweiten Schlüsselenzym des Glyoxylat-Wegs, Malat gebildet werden. Succinat wird via Succinat-Dehydrogenase (SdhC [EC 1.3.99.1]) zu Fumarat und weiter zu Malat via Fumarat-Hydratase (FumC2 [EC 4.2.1.2]) konvertiert.

Abbildung 55 stellt die relativen Konzentrationen der Intermediate des Zitronensäurezyklus und Glyoxylat-Wegs beider Referenzstämmen im Vergleich anhand eines Balkendiagramms dar. Auffallend dabei ist der α -Ketoglutarat-Pool trotz eines aktiven Glyoxylat-Wegs. Für *C. glutamicum* unter Verwendung von Acetat als Kohlenstoffquelle konnte anhand von Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation gezeigt werden (Gerstmeir et al., 2003), dass bei einem aktiven Glyoxylat-Weg die Isocitrat-Lyase ([EC 4.1.3.1]), die die Umsetzung von Isocitrat zu Glyoxylat und Succinat katalysiert, um Faktor 28.6

stimuliert wird. Dies deckt sich mit den Ergebnissen in Abbildung 55, in der gezeigt wird, dass ein verstärkter Fluss in Richtung Glyoxylat abzweigt.

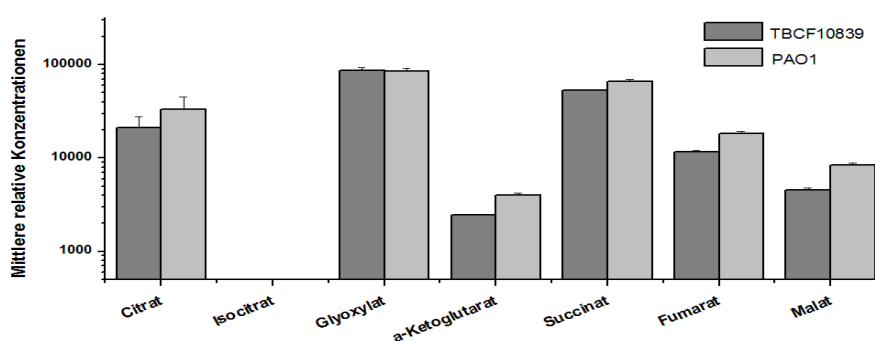


Abb. 55. Vergleich mittlerer relativer Konzentrationen der Intermediate des Zitronensäurezyklus und Glyoxylat-Wegs der Referenzstämmen TBCF10839 mit PAO1 bei exponentiellem Wachstum mit Citrat.

3.2.2.6 Succinat

Unter Verwendung von Succinat anstelle von Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle konnte eine spätere Aktivierung des Glyoxylat-Wegs in den *P. aeruginosa*-Referenzstämmen PAO1 und TBCF10839 beobachtet werden.

In der exponentiellen Wachstumsphase der Succinat-Kultivierung konnten in den Referenzstämmen weder Isocitrat noch Glyoxylat detektiert werden (Abb. 56 (a)). Dahingegen wurden beide Metabolite während des stationären Wachstums auf Succinat sowohl in TBCF10839 als auch in PAO1 nachgewiesen (Abb. 56 (b)). In einer bereits 1958 veröffentlichten Studie von Kornberg et al. wurde ein analoges Phänomen bei *P. ovalis* Chester beschrieben, bei dem die auf Succinat gewachsenen Zellen nur über ein geringes Level an Isocitrataktivität verfügen und ferner, dass die Expression der Isocitrat-Lyase (AceA [EC 4.1.3.1]) von der im Medium offerierten Kohlenstoffquelle abhing. In einer Studie von Kretzschmar et al. (2008) wurde gezeigt, dass eine signifikante Induktion des Enzyms Isocitratase (AceA [EC 4.1.3.1]) unter Verwendung von Acetat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle erfolgte. Lag konträr dazu Glucose oder Succinat als Kohlenstoff- und Energiequelle im Medium vor, so resultierte eine marginale oder keine detektierbare Expression des Enzyms und folglich des Glyoxylat-Wegs. Anhand der in Abbildung 55 dargelegten Ergebnisse beider Wachstumsphasen auf Succinat von PAO1 und TBCF10839 kann die Studie von Kretzschmar et al. (2008) verifiziert werden.

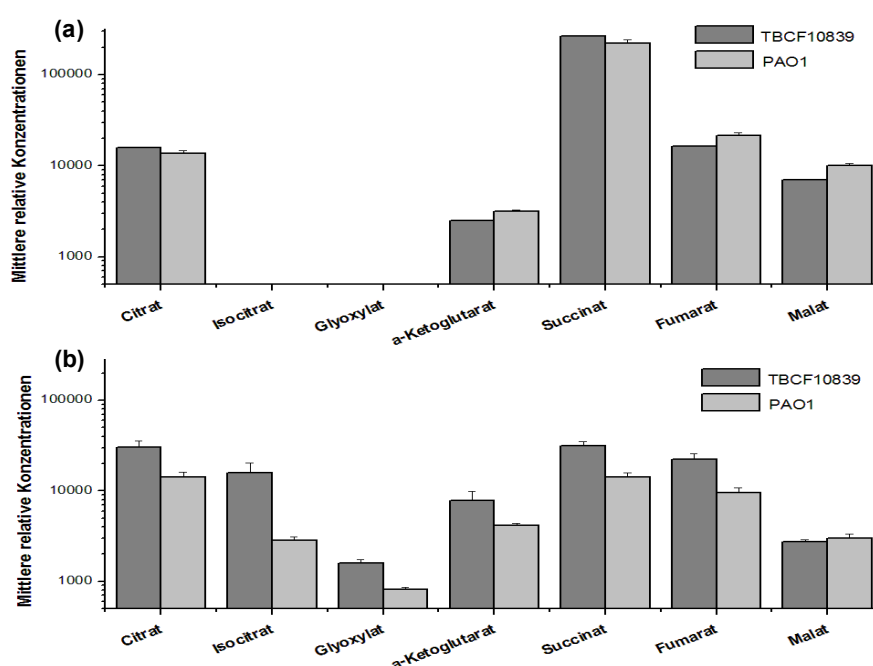


Abb. 56. Vergleich mittlerer relativer Konzentrationen der Intermediate des Zitronensäurezyklus und Glyoxylat-Wegs der Referenzstämme TBCF10839 und PAO1 bei exponentiellem (a) und stationärem (b) Wachstum mit Succinat.

Nachfolgend werden die relativen Metabolitkonzentrationen von TBCF10839 und PAO1 auf Succinat in der exponentiellen Wachstumsphase analysiert und in Abbildung 57 anhand eines Streudiagramms dargestellt. Dabei wird TBCF10839 auf der Ordinate und PAO1 auf der Abszisse abgebildet. Für die Korrelation wird ein Wert von 0.971 und für den relativen Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen ein Wert von 14.9% (TBCF10839) sowie von 8.6% (PAO1) kalkuliert. Die spezifische Wachstumsrate von TBCF10839 und PAO1 ist äquivalent ($\mu=0.57$).

Die Analyse des in Abbildung 57 (Tab. 59; S. 234) dargestellten Vergleiches von TBCF10839 mit PAO1 in der exponentiellen Wachstumsphase unter Verwendung von Succinat zeigt deutliche Unterschiede in dem metabolischen Verhalten der Referenzstämme zueinander auf. In TBCF10839, verglichen mit PAO1, liegen verstärkt Cadaverin, Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (Diethylenglycol, Triethanolamin, Ethanolamin, 1-Monostearoylglycerol, Dodecanoat, Octadecanoat), des Pyrimidin-Metabolismus (Thymin, Cytosin), Aminosäure-Derivate (5-Oxoprolin) sowie der Speicherstoff Trehalose vor.

Im Gegensatz dazu weisen vorwiegend Zuckerphosphate (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, 6-Phosphogluconat, Ribose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat, Glucosamin-

6-phosphat), ferner Intermediate des Purin-Metabolismus (AMP, Hypoxanthin) sowie der Aromat Tryptophan verminderte Konzentrationen in TBCF10839, verglichen mit PAO1, auf.

Die erhöhten Metabolitkonzentrationen der Fettsäuren in TBCF10839 reflektieren eine verstärkte Produktion der Membranlipide, die für die Generierung neuer Zellen im exponentielle Wachstum essentiell sind. Ferner könnte eine erhöhte Virulenz von TBCF10839 infolge der signifikanten Akkumulation von Cadaverin bei Wachstum auf Succinat als alleinige Kohlenstoffquelle vorliegen, was zu beweisen wäre.

Das metabolische Profil von PAO1 zeigt aufgrund der erhöhten Zuckerphosphate sowie der Intermediate des Purin-Metabolismus eine effiziente Energiebilanz.

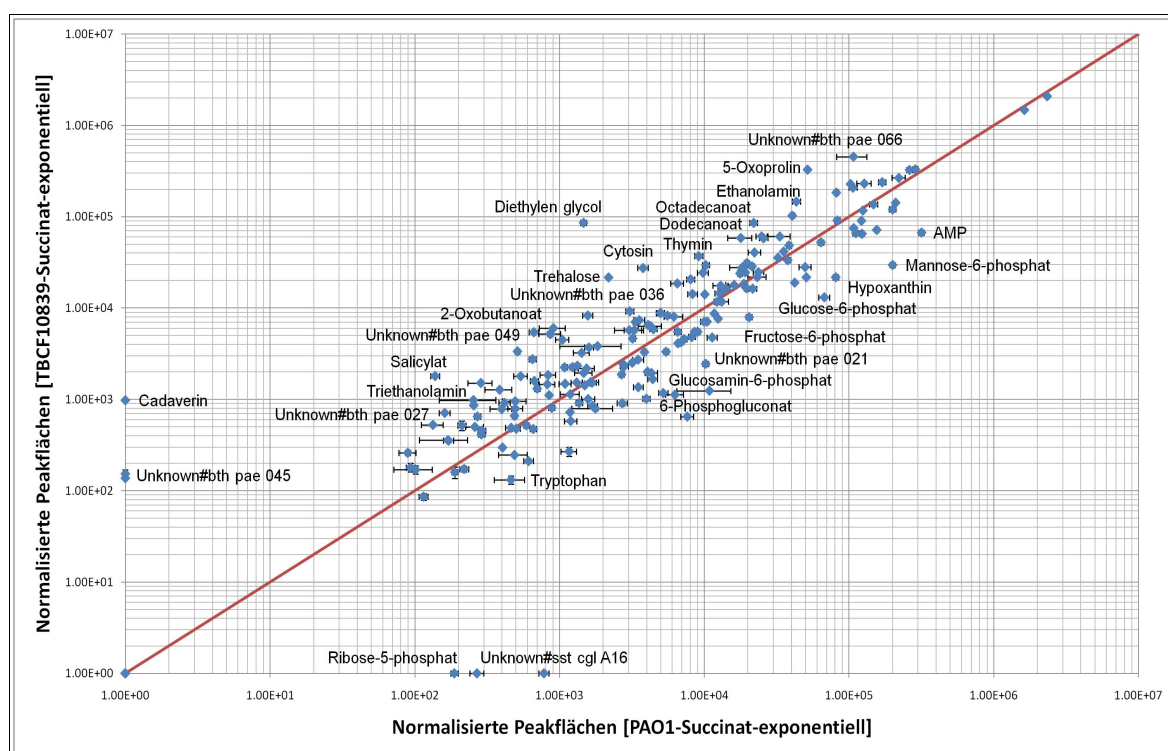


Abb. 57. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1 im exponentiellen Wachstum mit Succinat. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

3.2.3 Charakteristiken der *P. aeruginosa*-Transposonmutanten

Die verwendeten Transposonmutanten des Referenzstammes TBCF10839 wurden mir von Herrn Dr. Lutz Wiehlmann (Medizinische Hochschule Hannover – MHH) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um folgende Mutanten: Mutante 41D3 (PA5349), Mutante 19C2 (PA1572), Mutante 39D8 (PA1436), Mutante D8A6, Mutante MqoB⁻ (PA4640).

Bei der *P. aeruginosa* Mutante 41D3 wurde das Gen PA5349 (*P. aeruginosa* Genomprojekt www.pseudomonas.com), das für eine Rubredoxin Reduktase ([EC 1.18.1.1]) kodiert, durch eine Transposonintegration (sequenzspezifizierte Transposonmutagenese – STM) inaktiviert. Die Rubredoxin-Reduktase ist ein Mitglied der Oxidoreduktasen, Bestandteil der Elektronentransportkette sowie des Fettsäure-Metabolismus. Diese TM zeigt eine Beeinträchtigung in der Bildung von Acyl-Homoserinlactonen auf. Analysiert wurde dieses mittels Minimalagarplatten, die 0.5% Casein als einzige Kohlenstoffquelle enthielten. Zellen, die zur Sekretion von Proteasen befähigt sind, können auf diesen Platten wachsen. Die Mutante 41D3 (im Folgenden: PA5349) war nicht in der Lage, Casein als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Demzufolge besitzt die Mutante möglicherweise einen Defekt in der Sekretion von Proteasen, deren Expression durch das Quorum Sensing kontrolliert wird (Wiehlmann, 2001). Die Sekretion von Elastase wurde mittels Minimalagarplatten mit 0.5% Gelatine charakterisiert. Zellwachstum auf diesen Minimalagarplatten kann lediglich verzeichnet werden, wenn Elastase die in der Gelatine enthaltenen Proteine (Kollagen) abbauen können. Bei der Mutante konnte kein Wachstum beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass ein Defekt im QS vorlag. Allerdings konnte durch externe Supplementation mit Acyl-Homoserinlacton die Synthese der Acyl-Homoserinlactone und die Sekretion von Proteasen in der Mutante angeregt werden.

Ferner zeigte die Mutante ein zwanzigfach verringertes intrazelluläres Überleben in Granulozyten, verglichen mit dem Referenzstamm TBCF10839, auf. Granulozyten können Bakterien mittels reaktivem Sauerstoff in Phagolysosomen abtöten (Clifford & Repine, 1982). In der Studie von Wiehlmann et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass die TM eine hohe Sensitivität auf Wasserstoffperoxid aufwies. Der beobachtete Defekt der TM korreliert mit der Unfähigkeit, unter oxidativer Stresseinwirkung Eisen in reaktiven Enzymzentren im reduzierten Zustand zu binden. In den Studien von Frazao et al., (2000) sowie von Fareleira et al., (2003) wurde nachgewiesen, dass das NAD(P)H:Rubredoxin-Reduktase-Rubredoxin (RdxR-Rdx) System bedeutend für die oxidative Stressantwort in

Archaea und anaeroben Bakterien ist. Anhand der Strukturaufklärung in einer Studie von Hagelueken et al. (2007) konnte demonstriert werden, dass der Rdx-RdxR-Komplex von *P. aeruginosa* nicht nur in der Degradation von Alkanen involviert ist (van Beilen et al., 2002), sondern auch eine zentrale Rolle in der Regulation des zellulären Redoxstatus übernimmt.

Bei der *P. aeruginosa* Mutante 19C2 wurde das Gen PA1572, das als konserviertes hypothetisches Protein annotiert ist, ebenfalls durch eine Transposonintegration inaktiviert. Das Gen verfügt über eine konservierte Domäne mit hoher Ähnlichkeit zu Proteinen der Familie der ATP-NAD-Kinasen. Die Mutante 19C2 (im Folgenden: PA1572) zeigt im Vergleich zum Referenzstamm TBCF10839 eine deutlich geringere Produktion von Acyl-Homoserinlactonen auf sowie eine stark reduzierte Sekretion von Protease. Ebenfalls konnte durch externe Supplementation mit Acyl-Homoserinlactonen in der Mutante die Synthese von Acyl-Homoserinlactonen und die Sekretion von Protease induziert werden. Ferner zeigte auch diese Mutante eine deutlich reduzierte Überlebensfähigkeit in Granulozyten (Wiehlmann, 2001).

Bei der *P. aeruginosa* Mutante 39D8 wurde das Gen PA1436 inaktiviert, das für einen möglichen RND Efflux Transporter kodiert (Mima et al., 2005). Diese Mutante zeigte ebenfalls eine Beeinträchtigung in der AHL-Produktion auf. Allerdings war die C₄-HSL-Produktion nicht betroffen, sondern lediglich die C₁₂-HSL-Produktion, die vollständig inaktiviert wurde. Die Supplementation mit Acyl-Homoserinlactonen war auch bei dieser Mutante erfolgreich und führte zu der Synthese von Acyl-Homoserinlactonen und zu der Sekretion von Proteasen.

Bei der *P. aeruginosa* Mutante D8A6 ist keine entsprechende Gen-Nummer im PAO-Genom vorhanden. Die Mutante zeigte keine AHL-Produktion und dementsprechend keine Proteasesekretion auf. Daher konnte ebenfalls von einem Defekt im QS ausgegangen werden. Die Supplementation mit Acyl-Homoserinlactonen führte im Gegensatz zu den anderen Mutanten nicht zu einer Synthese von eigenem AHL und dadurch auch nicht zu einer Sekretion von Proteasen (Wiehlmann, 2001).

Bei der *P. aeruginosa* Mutante 14D12 wurde das Gen PA4640, das für eine Malat:Quinon Oxidoreduktase (MQO) kodiert, durch eine STM inaktiviert. MQO ist ein FAD-abhängiges membranassoziiertes Protein, das die Oxidation von Malat zu Oxaloacetate katalysiert. Die Elektronen werden auf die Quinone der Elektronentransferketten übertragen, und NAD wird nicht als Elektronenakzeptor angenommen. Normalerweise wäre NAD⁺ oder

NADP⁺ der Akzeptor, denn es agiert wie die CH-OH-Gruppe als Donor. Die zwei letzteren FAD-abhängigen Enzyme katalysieren die Konvertierung von Malat zu Oxaloacetat, wodurch die Elektronen auf die Quinone der Elektronentransferkette übertragen werden. MQO Aktivität in *P. aeruginosa* PAO1 wurde von Mizuno und Kageyama (1978) durch eine membranassoziierte Malat Dehydrogenase (MDH) Aktivität beschrieben, die Dichlorophenolindophenol und Phenazinmethosulfat als Elektronenakzeptor benutzt. MQO wurde in *C. glutamicum* (Molenaar et al., 1998, 2000), in *Helicobacter pylori* (Kather et al., 2000) und *E. coli* (van der Rest et al., 2000) analysiert. In *C. glutamicum* und *E. coli* sind acytoplasmatische NAD-abhängige MDH und eine membranassoziierte MQO vorhanden. Der Morphotyp der *P. aeruginosa* *mgoB*⁻ Mutante wird als sehr kleine Kolonie (nicht SCVs) beschrieben. Eine *mgoB*⁻ Mutante zeigt kein Wachstum auf Ethanol, Acetat, Fumarat sowie Malat. Ferner wird in dieser Mutante der Zentralstoffwechsel, speziell die Zucker- und Aminosäure-Biosynthese, beeinflusst, jedoch wird kein Effekt im QS-System erzielt (Kretzschmar et al., 2002; Rakhimova, 2007).

3.2.3.1 Grundlegende Beschreibungen der Metabolomdaten der *P. aeruginosa*-Transposonmutanten

Um den Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Metabolom von fünf *P. aeruginosa* Transposonmutanten (TM), verglichen mit dem Referenzstamm TBCF10839, zu charakterisieren, wurden relative, semiquantitative Metabolom-Datensätze sowohl innerhalb der exponentiellen als auch der stationären Wachstumsphasen analysiert.

Die für die folgenden Tabellen und Abbildungen verwendeten Proben bestehen jeweils aus sechs (Glucose, Succinat, Citrat, Cadaverin) bzw. zwei (Trypton) Replikaten der untersuchten Stämme. Die TM PA4640, die der Kontrolle der angewendeten GC-Q-MS-Methode diente, wurde nur auf Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle inkubiert.

Die gemessenen relativen Metabolitkonzentrationen der Replikate wurden je nach Abbildung zunächst gemittelt und anschließend normiert. Die Kulturen der Proben der exponentiellen Wachstumsphase der Versuchsansätze wiesen zu diesem Entnahmezeitpunkt die höchste spezifische Wachstumsrate und dadurch die niedrigste Verdopplungszeit auf (Tab. 36). Die für die stationäre Wachstumsphase verwendeten Proben wurden 2 Stunden nach Eintritt in die selbige entnommen.

Die während der verschiedenen Versuchsansätze in den TM und dem Referenzstamm detektierten Targets (T), die Anzahl der dabei nicht identifizierten Verbindungen (niV) und

der relative Gesamtfehler der mittleren Metabolitkonzentrationen sind in Tabelle 34 für die exponentielle Wachstumsphase und in Tabelle 35 für die stationäre Wachstumsphase aufgeführt.

Tab. 25. Tabellarische Übersicht über detektierte Targets innerhalb der verschiedenen Versuchsansätze der TM sowie des Referenzstammes im exponentiellen Wachstum. T = detektierte Targets insgesamt, davon nicht identifizierte Verbindungen (niV).

	Trypton			Glucose			Citrat			Succinat			Cadaverin		
	Targets		Fehler %	Targets		Fehler %	Targets		Fehler %	Targets		Fehler %	Targets		Fehler %
	T	niV		T	niV		T	niV		T	niV		T	niV	
D8A6	186	64	14	187	56	12	138	45	9	168	55	10	139	45	21
PA1436	186	64	23	187	56	7	141	45	10	171	55	15	139	45	23
PA1572	186	64	23	187	56	15	142	47	11	172	56	14	139	45	19
PA5349	186	64	16	188	57	14	142	47	9	171	55	13	139	45	22
PA4640	---	---	---	---	---	---	141	45	12	---	---	---	---	---	---
Σ	186	64	19	187.3	56.3	12	140.8	45.8	10	170.5	55.3	13	139	45	21

Tab. 26. Tabellarische Übersicht über detektierte Targets innerhalb der verschiedenen Versuchsansätze der TM sowie des Referenzstammes im stationären Wachstum. T = detektierte Targets insgesamt, davon nicht identifizierte Verbindungen (niV).

	Trypton			Glucose			Citrat			Succinat			Cadaverin		
	Targets		Fehler %	Targets		Fehler %	Targets		Fehler %	Targets		Fehler %	Targets		Fehler %
	T	niV		T	niV		T	niV		T	niV		T	niV	
D8A6	190	66	11	184	50	16	120	32	24	194	67	10	130	36	17
PA1436	190	66	13	184	50	11	133	39	7	194	66	10	128	35	9
PA1572	186	63	16	184	50	12	130	37	16	191	66	11	130	36	19
PA5349	186	63	23	184	50	17	126	35	9	193	67	11	130	36	10
PA4640	---	---	---	---	---	---	144	44	11	---	---	---	---	---	---
Σ	188	64.5	16	184	50	14	130.6	37.4	13	193	66.5	11	129.5	35.8	11

Aus den Tabellen 25 und 26 geht deutlich hervor, dass in den analysierten *P. aeruginosa*-Stämmen in den Versuchsansätzen mit Trypton, Glucose und Succinat als Kohlenstoffquelle eine annähernd gleiche Anzahl von Targets nachgewiesen werden konnten.

Unter Verwendung von Citrat und Cadaverin als alleinige Kohlenstoffquelle konnte die geringste Anzahl an Targets detektiert werden, das möglicherweise mit der Dekomposition der Metabolite während des Transports der Proben von der MHH zur TU-Braunschweig begründet werden könnte.

Denn entgegen der Erwartungen konnten unter Verwendung von Citrat, das eine präferierte Kohlenstoffquelle von *P. aeruginosa* darstellt (Lessie & Phibbs, 1984), im Mittel nur 141 (exponentiell) bzw. 131 (stationär) Targets erfasst werden, wovon 46 (exponentiell) bzw. 37 (stationär) nicht identifizierte Verbindungen waren. Dies würde die These der möglichen Dekomposition der Metabolite erklären.

Cadaverin hingegen repräsentiert eine nicht präferierte Kohlenstoffquelle. Dabei konnten lediglich 139 (exponentiell) bzw. 129 (stationär) Targets detektiert werden, wovon 45 (exponentiell) und 38.8 (stationär) nicht identifizierte Verbindungen darstellten.

Dass Cadaverin eine nicht favorisierte, langsam metabolisierte Nahrungsquelle für *P. aeruginosa* ist, wird an den spezifischen Wachstumsraten in Tabelle 27 deutlich. Dabei erzielen die untersuchten *P. aeruginosa* Stämme die niedrigste spezifische Wachstumsrate mit durchschnittlich $\mu = 0.19 \text{ h}^{-1}$ und dadurch bedingt die höchste Verdopplungszeit der Biomasse im Vergleich zu den anderen Versuchsansätzen.

Die höchste spezifische Wachstumsrate der charakterisierten Stämme wird unter Verwendung der undefinierten Kohlenstoffquelle Trypton, mit der Ausnahme der TM PA5349, erreicht. Letztere erzielt bei Wachstum auf Citrat die höchste spezifische Wachstumsrate (Tab. 27).

Tab. 27. Spezifische Wachstumsraten μ (h^{-1}) sowie Verdopplungszeiten t (h) von den TM und TBCF10839 unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen.

	TBCF10839		D8A6		PA1436		PA1572		PA5349		PA4640	
	μ (h^{-1})	t (h)	μ (h^{-1})	t (h)	μ (h^{-1})	t (h)	μ (h^{-1})	t (h)	μ (h^{-1})	t (h)	μ (h^{-1})	t (h)
Trypton	0.98	0.71	1.01	0.68	0.80	0.87	1.01	0.68	0.85	0.82	---	---
Glucose	0.74	0.93	0.71	0.97	0.68	1.00	0.65	1.07	0.62	1.11	---	---
Citrat	0.60	1.20	0.65	1.10	0.69	1.00	0.80	0.87	0.97	0.71	0.63	1.10
Succinat	0.57	1.22	0.72	0.96	0.72	0.96	0.88	0.79	0.79	0.88	---	---
Cadaverin	0.15	4.49	0.22	3.10	0.21	3.26	0.18	3.81	0.20	3.54	---	---

Um folgend den Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Metabolom der TM sowie des Referenzstammes TBCF10839 zu analysieren, werden zunächst die erhobenen Metabolomdaten in einer PCA (Abb. 58) zusammengefasst. Dabei repräsentiert jeder Punkt die gemittelten relativen Metabolitkonzentrationen der Replikate von jedem Stamm entweder aus der exponentiellen oder stationären Wachstumsphase der entsprechenden Kohlenstoffquellen.

In der PCA (Abb. 58) ist eine separate Clusterung der einzelnen Versuchsansätze deutlich zu erkennen. Das Medium mit Trypton als undefinierte Kohlenstoffquelle grenzt sich von den definierten Kohlenstoffquellen Glucose, Succinat, Citrat und Cadaverin ab.

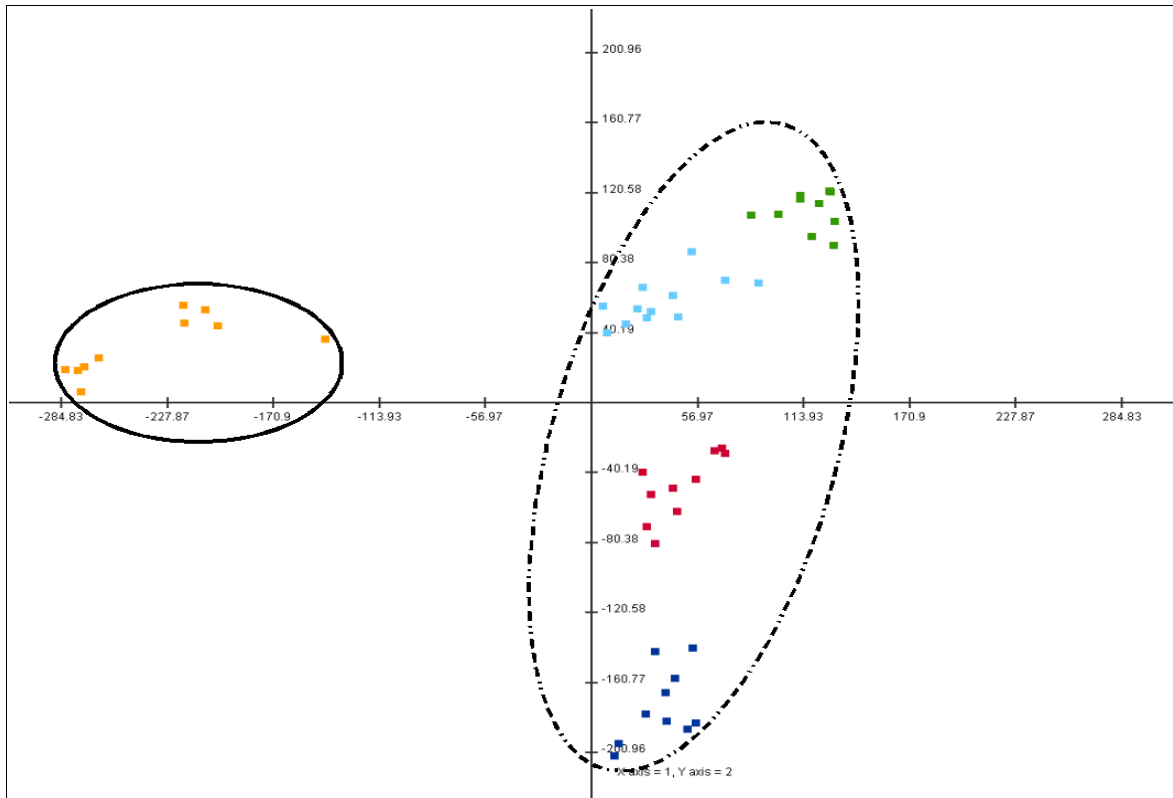


Abb. 58. PCA der gemittelten relativen Metabolitkonzentrationen der Replikate von TBCF10839 sowie der fünf TM auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen im exponentiellen und stationären Wachstum. Die durchgezogene Linie umfasst das Medium Trypton (orange), die gestrichelte die Medien Glucose (dunkelblau), Succinat (rot), Citrat (hellblau) und Cadaverin (grün). Die 1. und 2. Komponente beschreiben zusammen 45% der Gesamtvarianz.

Das Ergebnis der PCA (Abb. 58) kann durch einer HCA (Abb. 59) ergänzt und verifiziert werden, in der ebenfalls eine Medien-spezifische Clusterung der analysierten Stämme beobachtet werden kann.

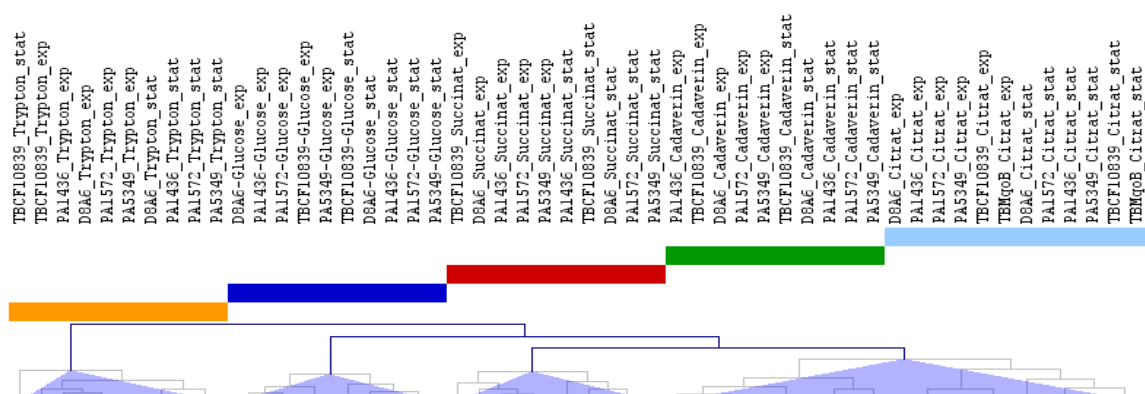


Abb. 59. HCA der gemittelten relativen Metabolitkonzentrationen der Replikate von TBCF10839 sowie der fünf TM auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen im exponentiellen und stationären Wachstum. Die farbigen Balken repräsentieren die Kohlenstoffquellen und die fliederfarbenen Dreikante Untercluster.

Ein möglicher Grund für die Abgrenzung des Mediums Trypton sowohl in der PCA (Abb. 58) als auch in der HCA (Abb. 59) könnte der hohe Gehalt an Aminosäuren im Medium darstellen. Die Oligopeptide von Trypton werden von den Proteasen von *P. aeruginosa* zu Aminosäuren degradiert. Der resultierende hohe Gehalt an Aminosäuren im Medium könnte *P. aeruginosa* befähigen, eine mögliche Mutation in einem Transporter, Metabolismus oder Biosyntheseweg – durch Import, Konvertierung oder Katabolismus einer oder mehrerer relevanter Aminosäuren – effizient zu kompensieren. Die Aminosäuren im Medium stellen für die analysierten Stämme eine wesentliche Nahrungsquelle dar, was durch die hohen spezifischen Wachstumsraten bekräftigt wird (Tab. 37).

Im Gegensatz dazu bilden die Minimalmedien sowohl in der PCA (Abb. 89) und HCA (Abb. 90) zunächst ein gemeinsames Cluster, in dem sich jeweils die einzelnen Medien voneinander abgrenzen. Dies könnte in direkter Relation mit einer geringeren Präferenz von *P. aeruginosa* für diese Kohlenstoffquellen stehen. Bei Wachstum auf diesen Medien wird den *P. aeruginosa*-Stämmen lediglich eine Kohlenstoffquelle offeriert. Dies korreliert erneut mit den geringeren spezifischen Wachstumsraten, die in den Minimalmedien, verglichen mit dem Medium Trypton, erreicht werden.

Abschließend wird ein Vergleich der nach Pearson kalkulierten Korrelationskoeffizienten der *P. aeruginosa* TM in Bezug auf den Referenzstamm unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen im exponentiellen sowie stationären Wachstum gezeigt.

Tab. 28. Nach Pearson kalkulierte Korrelationskoeffizienten der TM in Bezug auf den Referenzstamm TBCF10839 unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen in der exponentiellen sowie stationären Wachstumsphase

	Trypton		Glucose		Citrat		Succinat		Cadaverin	
	Exp.	Stat.	Exp.	Stat.	Exp.	Stat.	Exp.	Stat.	Exp.	Stat.
TBCF10839	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D8A6	0.978	0.812	0.955	0.769	0.786	0.572	0.928	0.857	0.969	0.898
PA1436	0.981	0.925	0.921	0.876	0.809	0.661	0.946	0.677	0.967	0.921
PA1572	0.972	0.588	0.976	0.887	0.925	0.864	0.939	0.760	0.960	0.921
PA5349	0.985	0.538	0.986	0.821	0.927	0.804	0.935	0.804	0.967	0.921
PA4640	---	---	---	---	0.946	0.915	---	---	---	---

Die Analyse der Korrelationen (Tab. 38) zeigt deutlich, dass in den exponentiellen Wachstumsphasen aller Kohlenstoffquellen stets eine höhere Korrelation der TM in Bezug auf den Referenzstamm erzielt wird als in den relevanten stationären Wachstumsphasen. Die Unterschiede in den Korrelationen zwischen den Wachstumsphasen beruht möglicherweise auf den Mutationen in den TM, die sich - der Korrelationen nach -

verstärkt auf das stationäre Wachstum auswirken. Dabei ist der analoge Trend der TM, sich vom Referenzstamm zu entfernen, auffällig und kann exemplarisch anhand einer PCA verifiziert werden (Abb. 107; S. 235). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich um einen Defekt in den TM handelt, der in allen TM den gleichen Effekt erzielt. Die einzige Gemeinsamkeit der TM, mit Ausnahme der PA4640, ist eine gehemmte Acyl-Homoserinlacton-Synthese und folglich eine fehlende Proteasesekretion, was auf einen *knock-out* im QS-System schließen lässt. Die QS-regulierenden Gene werden sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase exprimiert, wie in der Studie von Whiteley et al. (1999) an Klasse I - IV-Mutanten gezeigt werden konnte. Die Klassen I (z.B. *pqsH* (Quinolone-Signal Produktion)) und III (z.B. *rhII*, *rhIAB* (Rhamnolipid-Synthese), *hcnB* (Hydrogencyanid-Synthese), *phzC* (Phenazin-Synthese)) werden in der exponentiellen Wachstumsphase verstärkt exprimiert, die Klassen II (*pvdD* (Pyoverdine-Synthese)) und IV (*lasB* (Elastase), *acrB* (*Multidrug Efflux Pump*)) in der stationären Wachstumsphase. Weil die TM eine reduzierte bzw. keine Farbstoffproduktion in Flüssigmedien (Klasse II) sowie Proteasesekretion (Klasse IV) vorweisen konnten, lässt das auf eine Klasse II und IV Mutation schließen.

In einer Studie von van Delden et al. (1998) wurde gezeigt, dass *P. aeruginosa* QS-Mutanten in Mangelmedien mit einer Kohlenstoffquelle die Elastase- und Rhamnolipid-Produktion in Abwesenheit eines funktionalen *las* QS-Systems regenerieren konnten.

In der Medizinischen Hochschule Hannover konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die TM, nach Zugabe einer Kohlenstoffquelle auf Casein-Agarplatten, in der Lage waren, Proteasen zu sekretieren, was ohne den Zusatz nicht möglich war. Durch Zugabe von beispielsweise Glucose, Citrat oder Succinat konnte die Proteasesekretion in den TM regeneriert werden, was durch Zugabe von Casein oder Cadaverin nicht zu beobachten war. Dieses Phänomen wird als metabolische Komplementation bezeichnet (persönliche Mitteilung von Frau Sonja Horatzek).

Werden daraufhin die Korrelationen der TM bei Wachstum auf Glucose, Citrat, Succinat oder Cadaverin als Kohlenstoffquelle (Tab. 38) berücksichtigt, kann festgestellt werden, dass der Unterschied zwischen den Wachstumsphasen bei einer möglichen Regeneration der Proteasesekretion und damit des QS-Systems in den TM deutlich größer ist.

Dieses Ergebnis zeigt folglich, dass das durch Transposonintegration inaktivierte Gen mit einer (möglichen) Regeneration des QS-Systems (z.B. bei Wachstum auf Succinat) einen bedeutenderen Einfluss auf das Metabolom erzielt als ein inaktiviertes Gen alleine.

Basierend auf den in diesem Kapitel gezeigten sich ähnelnden Charakteristiken der TM in Bezug auf TBCF10839, wird im Anschluss nur das Metabolom der TM PA5349 analysiert.

3.2.3.2 Metabolische Profile der Transposonmutante PA5349 bei Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Die metabolischen Profile der TM PA5349 und des Referenzstammes TBCF10839 werden unter Verwendung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen anhand von Streudiagrammen verglichen und anschließend beschrieben. Durch die Division der auf den Achsen eines Streudiagramms aufgetragenen normierten Peakflächen der Metabolite (Ordinate/Abszisse) resultieren Faktoren. Faktoren mit den Werten > 2 bzw. < 0.5 werden diskutiert und stellen entsprechend einen hoch- bzw. herunterregulierten Metaboliten dar und sind im Anhang (Tab.60-690; S.235-247) detaillierter aufgeführt. Die diskutierten Stoffwechselwege sind im Anhang (Zusatzblätter 1 und 2 für *P. aeruginosa* PAO1) dargestellt.

Einleitend werden die metabolischen Profile der TM PA5349 mit dem TBCF10839 bei Wachstum auf der undefinierten Kohlenstoffquelle Trypton charakterisiert.

3.2.3.3 Trypton

Bei dem Vergleich der metabolischen Profile der TM PA5349 mit dem Referenzstamm TBCF10839 unter Verwendung von Trypton konnten in der exponentiellen Wachstumsphase nur geringe Unterschiede detektiert werden (Abb. 60; Tab. 60; S.235).

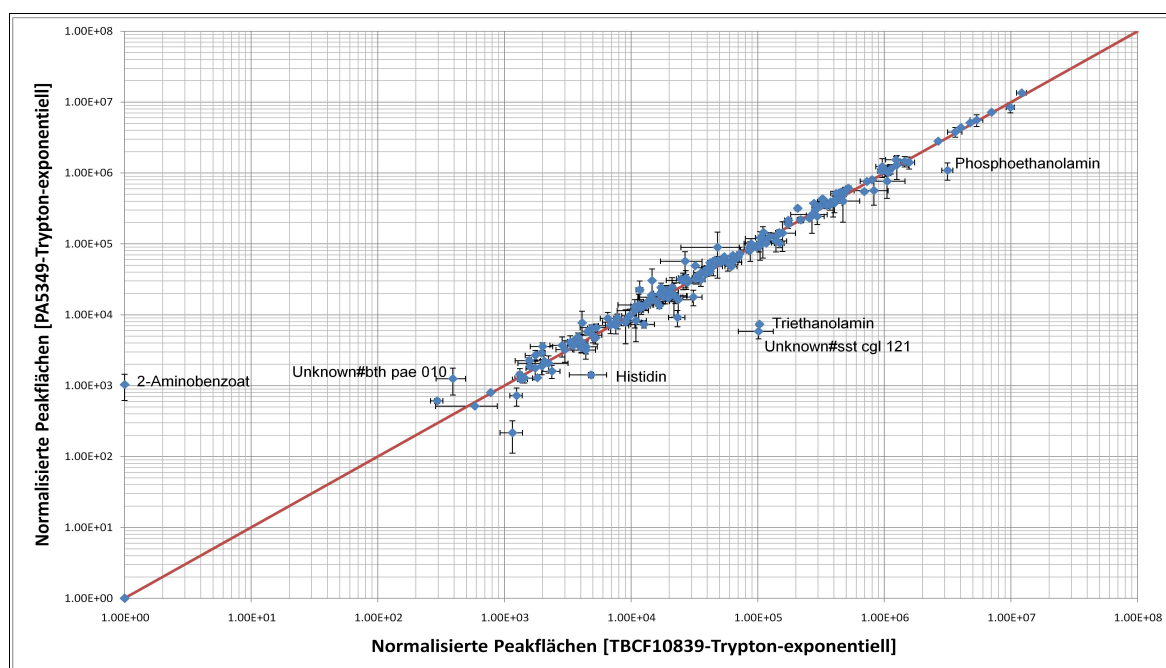


Abb. 60. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Trypton in der exponentielle Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor > 3 .

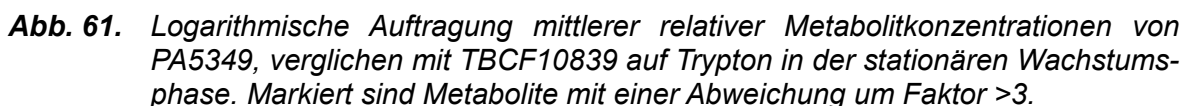
Lediglich die Metabolite 2-Aminobenzoat (Anthranilat) sowie die unbekannte Substanz Unknown#bth_pae_010 weisen eine Akkumulation in TM PA5349, verglichen mit dem TBCF10839, auf, wobei 2-Aminobenzoat lediglich in der TM detektiert wurde.

Konträr dazu liegen Phospho- und Triethanolamin, Komponenten der Phospholipide, sowie Histidin in reduzierten Konzentrationen in TM PA5349 vor. Die Verminderung von Histidin sowie die parallele Akkumulation (2-fach) von Adenin und Adenosin in TM PA5349 könnte in der engen Verbindung der Histidin-Biosynthese mit dem Purin-Metabolismus begründet liegen. Ausgangspunkt der Biosynthesewege zu Histidin und Purin ist die Komponente Phosphoribosyl-Pyrophosphat. Die Histidin-Synthese ist ein ATP-verbrauchender und die Purin-Synthese ein ATP-generierender Prozess. Aufgrund dessen und der verminderten Wachstumsrate von TM PA5349, weisen diese Intermediate ein gegensätzliches Verhalten auf.

Die Verminderung von Phospho- und Triethanolamin könnten in Relation mit dem von der Mutation betroffenen Gen stehen. Liegt eine Mutation in der Elektronentransportkette vor, so könnte der Energiestoffwechsel und folglich der Fettsäure-Metabolismus gehemmt sein.

2-Aminobenzoat, Vorläufer von Tryptophan sowie Intermediat der Benzoat-Degradation, ist lediglich in der TM PA5349 detektiert worden und könnte auf einen ineffizienten Katabolismus von Tryptophan hinweisen. Dies könnte mit dem ebenfalls erhöhten Tryptophan-Pool bestätigt werden.

Die Analyse des metabolischen Profils der TM PA5349 sowie des TBCF10839 in der stationären Wachstumsphase (Abb. 61; Tab. 61; S.236-237) zeigt deutliche Veränderungen im Metabolismus beider Stämme an. Die Akkumulation der Vorläufer der Aromaten (3-Dehydroshikimat, Shikimat) und des Aromaten Phenylalanin sowie Intermediate des Pyrimidin-Metabolismus (Cytosin, Thymin) in der TM PA5349, verglichen mit dem TBCF10839, stehen im Gegensatz zu der Verminderung glycolytischer Metabolite sowie deren Phosphate (Glucose, 6-Phosphogluconat, 3-Phosphoglycerat, Glucosamin-6-phosphat, Lactose, Maltose) und Intermediate des Purin-Metabolismus (AMP). Die Verstärkung der Phenylalanin-, Tyrosin-, Tryptophan-Biosynthese in der TM PA5349 weist auf eine reduzierte *Pseudomonas*-Quinolone-Signal-Biosynthese (vgl. Kap. 3.2.2.1, Abb. 45) hin. Zudem zeigt das Metabolom der stationären Wachstumsphase der TM PA5349 die Reduktion an Intermediaten des Zucker-Metabolismus. Dies könnte auf einen reduzierten Energie-Metabolismus der TM PA5349 hindeuten, was mit einer verminderten Biomasseproduktion im stationären Wachstum korreliert.



Die in Abbildung 62 (Tab. 62; S.237-239) visualisierte Gegenüberstellung relativer mittlerer Metabolitkonzentrationen aus der exponentiellen Wachstumsphase von TM PA5349 und TBCF10839 auf Glucose zeigen ein antiparalleles Verhalten: einerseits glycolytischer, phosphorylierter Metabolite (Ribose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat, Glucosamin-6-phosphat, Erythrose-4-phosphat, Mannose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, 6-Phosphogluconat, Fructose-6-phosphat) sowie Vorläufer der Häm-Biosynthese (5-Aminolevulinat) und andererseits der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (Diethylen glycol, 1-Monooleoylglycerol, Oleat amid, 1-Monopalmitoylglycerol, Hexadecanoat, 2-Monooleoylglycerol, Phosphoethanolamin), des Osmolyten bzw. Speicherstoffs (Trehalose) sowie Intermediate der Lysin-Degradation (Cadaverin, 5-Aminopentanoat, Glutarat).

Allerdings reflektiert das Metabolom der TM PA5349, verglichen mit dem TBCF10839, eine reduzierte Produktion der Membranlipide, die jedoch für die Generierung neuer Zellen im exponentielle Wachstum essentiell sind.

Dieses entgegengesetzte Verhalten der erhöhten glycolytischen Komponenten und den deutlich verringerten Intermediaten des Fettsäure-Metabolismus in der TM PA5349 in Bezug auf den Referenzstamm könnte durch die Transposonintegration erfolgte Inaktivierung der Rubredoxin-Reduktase hervorgerufen worden sein und einen Defekt in der Umsetzung von Fettsäuren in der TM PA5349 darstellen.

Andernfalls könnte dieses konträre Verhalten auch auf unterschiedlichen Überlebensstrategien der TM PA5349 und des Referenzstammes TBCF10839 beruhen, wobei die TM PA5349 die Energie über den Entner-Doudoroff-Weg, den Zitronensäurezyklus, der Atmungskettenphosphorylierung sowie der Häm-Biosynthese und der Referenzstamm die Energie über die β -Oxidation generiert, was mit Hilfe von Transkriptomstudien zu beweisen wäre.

Cadaverin, als Polyamin sowie putativer Indikator für den Grad der Virulenz, könnte auf eine reduzierte Virulenz von TM PA5349 hindeuten. Begründet werden könnte dies mit einem analogen und beständigen Muster, dass die Akkumulation von Cadaverin mit dem jeweiligen virulenteren Stamm korreliert (vgl. Kap. 3.2.2.3).

Unknown#bth_pae 068 konnte im Zuge der GC-Q-MS Analysen der vorliegenden Arbeit sowie anhand der NIST-Bibliothek mit einer Wahrscheinlichkeit von 95.2% als Palmitoleat (Synonym: cis-9-Hexadecenoat) identifiziert werden.

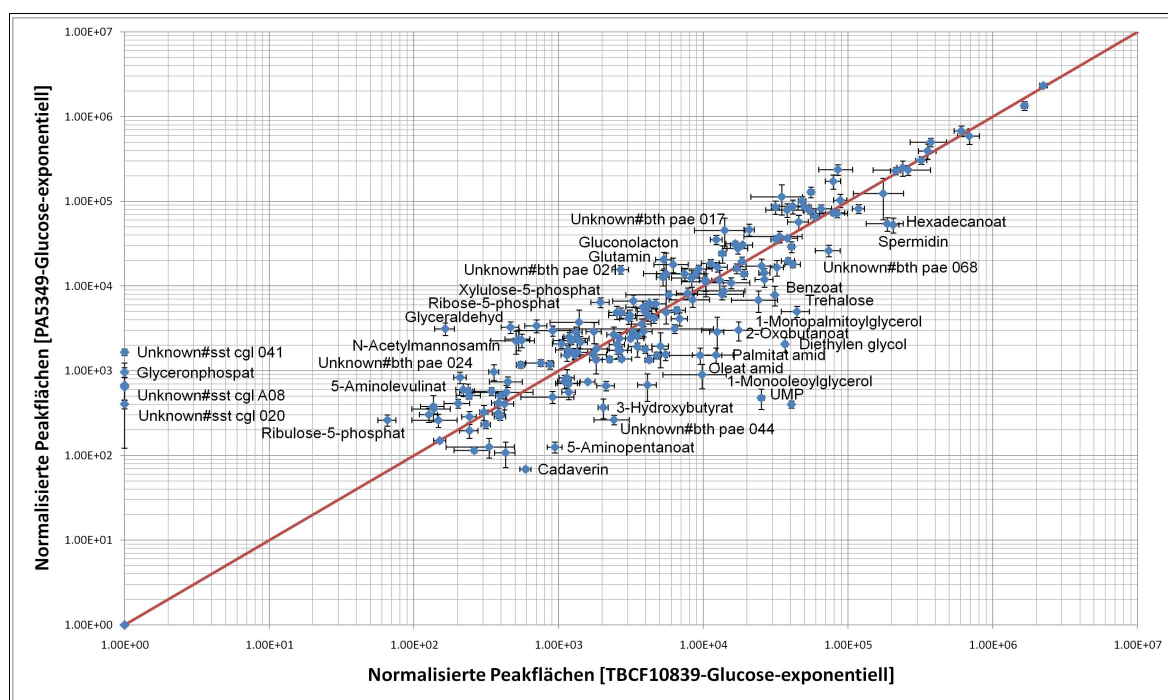


Abb. 62. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Glucose in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Die Analyse der stationären Wachstumsphase von TM PA5349 und TBCF10839 verdeutlicht einen weitgehend analogen Charakter der Metabolite, wie der Vergleich der exponentiellen Wachstumsphase zeigte, ausgenommen Norleucin sowie Norvalin. Beides sind nichtproteinogene Aminosäuren, Nebenprodukte der verzweigtkettigen Aminosäure-Biosynthese, die in der TM PA5349 lediglich auf Glucose, Norleucin zusätzlich auf Succinat, in der stationären Wachstumsphase in signifikanten Konzentrationen akkumuliert detektiert wurden.

Laut der Studie von Koide et al. (1980) wurde das Enzym L-Tryptophan- α -Ketoisocaproate Aminotransferase ([EC 2.6.1.28]) aus *Pseudomonas* sp. (Koide et al., 1977 a, b) aufgereinigt, das die Reaktionen einerseits von Phenylalanin und 2-Oxohexanoat zu Phenylpyruvat und L-Norleucin und andererseits von Phenylalanin und 2-Oxopentanoat zu Phenylpyruvat und Norvalin katalysiert. In *P. aeruginosa* konnten bislang weder Norleucin noch Norvalin via GC-Q-MS detektiert und in dessen Zentralstoffwechsel eingebunden werden. Beide können die Funktion eines Analogon einnehmen, indem der Einbau in die Proteine via Mis-Aminoacetylierung der tRNA - z.B. Leucin-tRNA via Norvalin, Methionin-tRNA via Norleucin in *E. coli* (Munier & Cohen 1956 & 1959; Cowie et al., 1959; Bogosian et al., 1989; Apostol et al., 1997; Soini et al., 2008) erfolgt. Norleucin inhibiert die DNA Methylierung und Replikation, das in der Wirts-Restriktion und Degradation chromosomaler DNA resultiert (Lark, 1968; Lark & Arber, 1970).

In Abbildung 63 werden die Stoffflüsse des Zentralstoffwechsels der stationären denen der exponentiellen Wachstumsphase in den TM D8A6, PA1436, PA1572 sowie PA5349 gegenübergestellt und erläutert. Dabei symbolisieren die roten Metabolite eine Verminderung und die grünen Metabolite eine Akkumulation der Metabolitkonzentrationen des relevanten Stoffwechselwegs in der stationären Wachstumsphase.

Parallel zu der Akkumulation von Norvalin und Norleucin in den TM im stationären Wachstum, ausgehend von der Kettenverlängerung von Pyruvat über α -Ketobutyrat und α -Ketovalerat zu α -Ketocaproat (Soini et al., 2008), sowie von β -Alanin, Pantothenat und Methionin, erfolgt eine Reduktion der Konzentrationslevel von Glycin, Serin, Threonin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin sowie Tryptophan. Infolge einer putativen Mis-Aminoacetylierung von Methionin und bedingtem reduzierten Proteineinbaus könnte die Akkumulation von Methionin und Vorläufer-Metaboliten erklärt werden. Der Abbau des Phenylalanin-, Valin-, Leucin- sowie Isoleucin-Pools könnte in Relation mit der Norleucin- und Norvalin-Generierung stehen, da die Stoffflüsse in konträre Richtungen abzweigen.

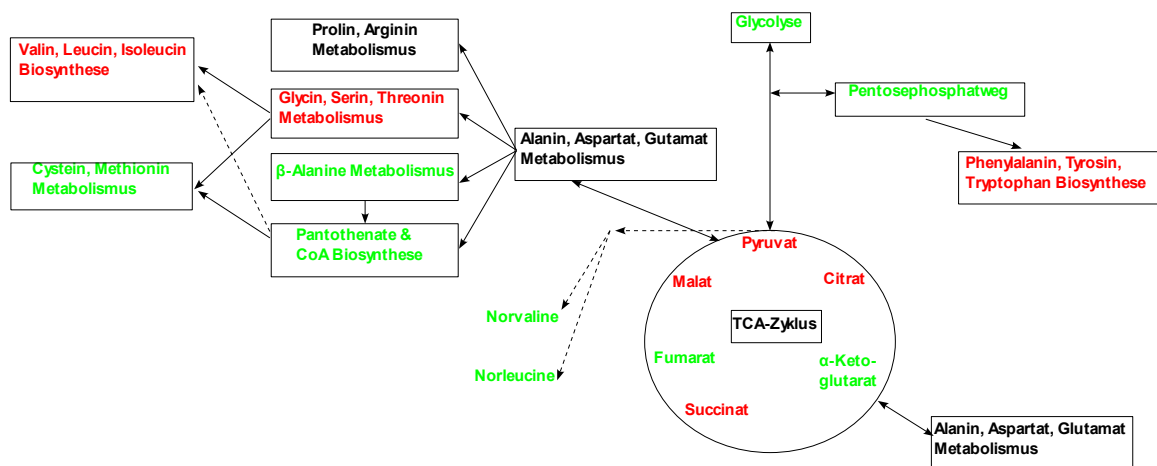


Abb. 63. Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels in den TM D8A6, PA1436, PA1572 und PA5349 bei Wachstum auf Glucose. Rote Metabolite symbolisieren eine Verminderung, grüne eine Akkumulation der Metabolitkonzentrationen des relevanten Stoffwechselwegs im stationären, verglichen mit dem exponentiellen Wachstum. Die gestrichelten Linien deuten den putativen Syntheseweg von Norleucin & Norvalin in den TM D8A6, PA1436, PA1572, PA5349 an.

In der Studie von Apostol et al., (1997) wurde bereits über das Absinken des Leucin-Pools in *E.coli*, der Akkumulation von Pyruvat, resultierend in einem direkten Anstieg von Norvalin, gefolgt von einer späteren Akkumulation von Norleucin, beschrieben.

Die in Abbildung 63 dargestellten Konzentrationslevel der TM von *P. aeruginosa* korreliert mit der Studie von Apostol et al. (1997) und könnte diese weitgehend bekräftigen.

3.2.3.5 Citrat

Citrat, eine favorisierte Kohlenstoffquelle von *P. aeruginosa*, wird über den Zitronensäurezyklus sowie Glyoxylat-Weg konvertiert. Der Vergleich von TM PA5349 mit TBCF10839 mittels eines Streudiagramms bei Wachstum auf analysiert (Abb. 64; Tab. 63; S. 239-240). Die TM PA5349 weist in der exponentiellen Wachstumsphase akkumulierte Konzentrationen glycolytischer Komponenten (Fructose-6-phosphat, Xylulose-5-phosphat, Glucose-6-phosphat, Ribose-5-phosphat, Mannose-5-phosphat, Glyceronphosphat), des AHL- (Homoserin, Methionin, 5'-Methylthioadenosin) und Nukleotid- (Thymin, Adenosin, Uracil, Uridin) Metabolismus, von Aminosäuren (Prolin, Threonin, Ornithin, Tryptophan, Valin, Aspartat, Glycin, N-Acetyl-glutamat) sowie von Nicotinamid auf. Dies verdeutlicht sowohl eine effiziente Energiebilanz als auch Adaptation an das Citrat-Medium, verifiziert anhand einer klar erhöhten spezifischen Wachstumsrate, verglichen mit dem Referenzstamm TBCF10839 (Tab. 27).

Außerdem könnte bei Wachstum der TM PA5349 auf Citrat die Induktion des AHL-Metabolismus, mit Homoserin, Methionin und 5'-Methylthioadenosin, zu einer Aktivierung des QS-Systems geführt haben, was die Theorie der Regeneration der Proteasesekretion bzw. des deletierten QS-Systems und dadurch die metabolische Komplementation der Mutanten stützen würde (vgl. Kap. 3.2.3.1).

Die in der TM PA5349, verglichen mit dem Referenzstamm TBCF10839, reduziert vorliegenden Intermediate des Fettsäure-Metabolismus weisen auf eine verminderte Produktion der Membranlipide hin, die allerdings für das exponentielle Wachstum essentiell sind.

Ferner könnten die bereits bei Wachstum auf Glucose beschriebenen Gründe ebenfalls für die Kultivierung auf Citrat gelten.

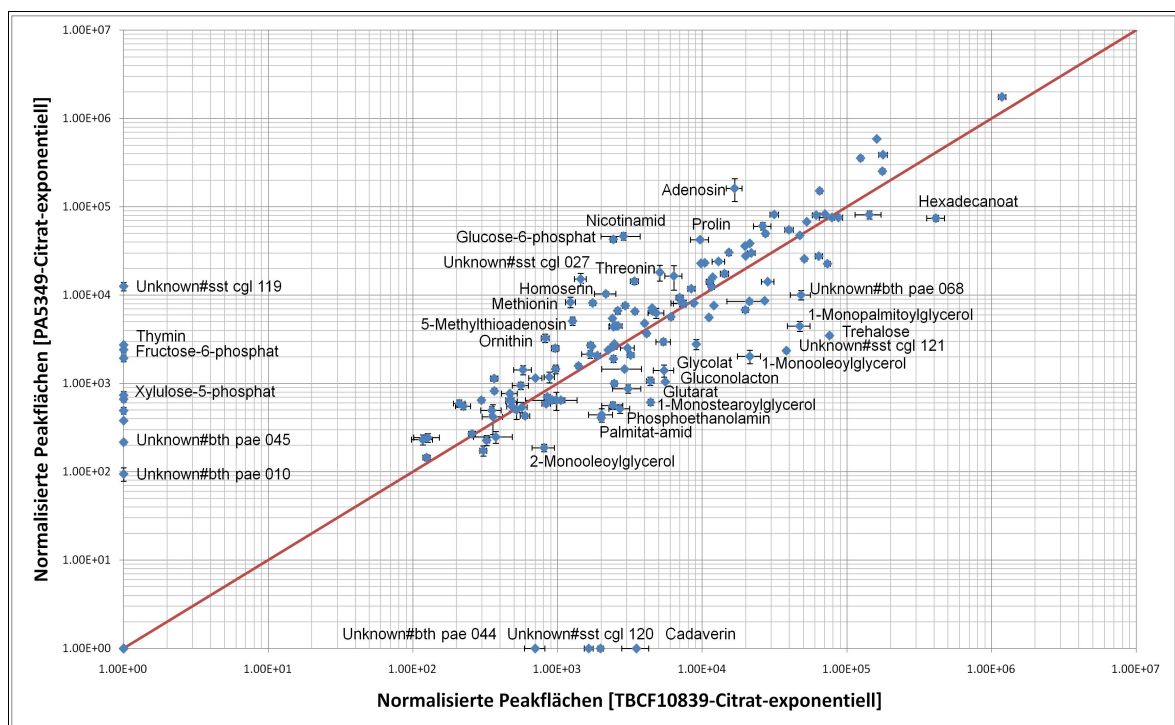


Abb. 64. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Citrat in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

In der stationären Wachstumsphase (Abb. 65; Tab. 64; S. 241-242) liegen in PA5349, verglichen mit TBCF10839, lediglich die Intermediate der Lysin-Degradation (Cadaverin, Pipecolat) und zwei unbekannte Substanzen akkumuliert vor.

Konträr dazu weisen glycolytische, Nukleotid- sowie Fettsäure-Metabolismus Intermediate verringerte Konzentrationen in TM PA5349 auf.

Dieses metabolische Profil der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839, verdeutlicht eine reduzierte Proteinbiosynthese. Möglicherweise liegt eine gesteigerte Virulenz in TM PA5349 infolge der Cadaverin-Akkumulation im stationären Wachstum vor.

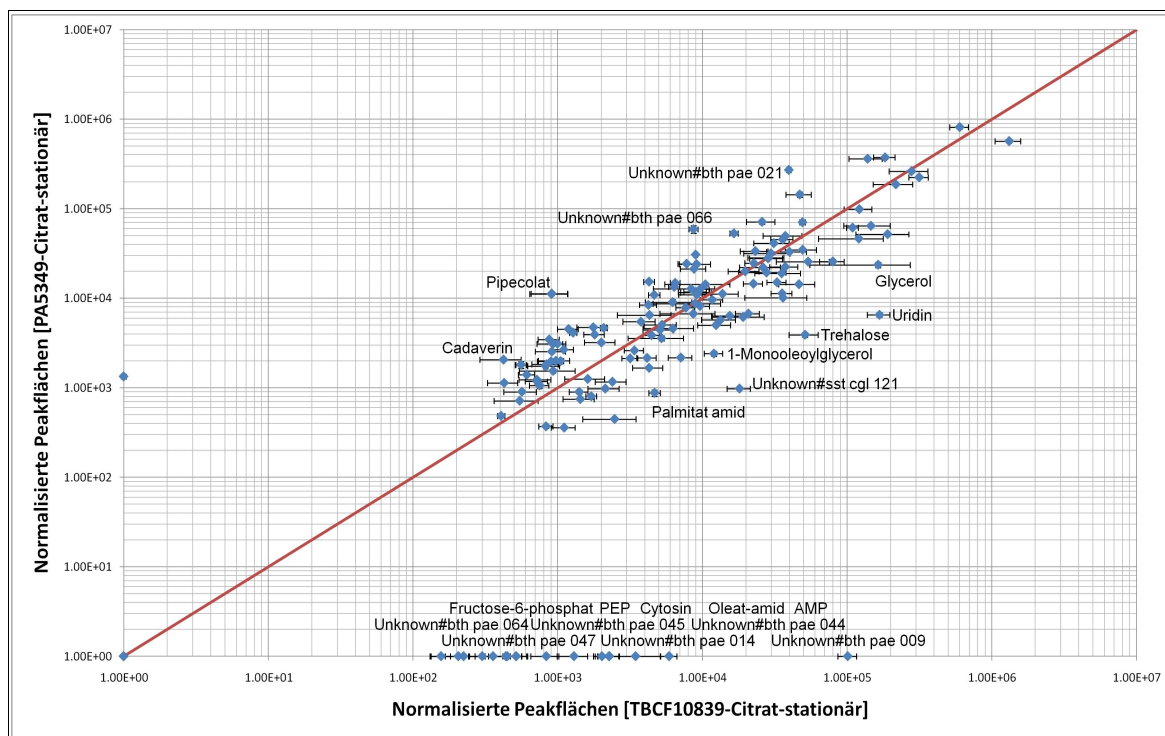


Abb. 65. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Citrat in der stationären Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Anschließend wird die TM PA4640, *mgoB*⁻ Mutante, mit dem Referenzstamm TBCF10839 bei Wachstum auf Citrat in der exponentiellen Wachstumsphase verglichen (Abb. 66; Tab. 65; S.242-243). Die Analyse dieser Mutante unter Verwendung von Citrat als Kohlenstoffquelle diente der Kontrolle der in der vorliegenden Arbeit angewandten Aufarbeitungs- sowie GC-Q-MS-Analyse-Methode.

Das metabolische Profil der TM PA4640, verglichen mit dem Referenzstamm in der exponentiellen Wachstumsphase auf Citrat, dargestellt in Abbildung 66, zeigt eine deutliche Erhöhung in den Konzentrationen des Fumarat- sowie Malat-Pools, von Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, einiger Aminosäuren (Lysin, Ornithin, Tryptophan, Homoserin) sowie Intermediate des Nukleotid-Metabolismus (Thymin, Adenosin), jedoch keine Veränderungen des AHL-Metabolismus. Letzteres würde die These bestätigen, dass in dem QS-System dieser Mutante keine Veränderungen vorliegen.

Demgegenüber liegen in der TM PA4640, verglichen mit dem Referenzstamm, verminderte Konzentrationen von Citrat sowie von Intermediaten des Fettsäure-Metabolismus vor.

Aufgrund des metabolischen Profils dieser TM PA4640 kann die Mutation in der Konvertierung von Malat zu Oxaloacetat verifiziert werden. Gleichzeitig wird eine Kompensation der Mutation infolge des analogen Wachstumsverhaltens sowie der Akkumulation von Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Aminosäuren, Nicotinamid sowie von Thymin und Adenosin in der TM PA4640, verglichen mit dem Referenzstamm, angedeutet. Würde die Mutation nicht kompensiert, würde ein stark gehemmtes Wachstum eingeleitet und ferner ein größerer Effekt im metabolischen Profil detektiert werden.

Diese Ergebnisse können die Studie von Rakhimova et al. (2008) nur teilweise bekräftigen. In dieser Studie wurde die TM PA4640 detaillierter charakterisiert und Hypothesen über das metabolische Verhalten dieser Mutante aufgestellt. Allerdings konnte mittels der angewendeten GC-Q-MS-Methoden bewiesen werden, dass die Mutante in der Lage ist, den *knock-out* von MqoB zu kompensieren, indem sie verstärkt Aminosäuren generiert, die für die Proteinbiosynthese und folglich für die Biomasseproduktion von großer Bedeutung sind.

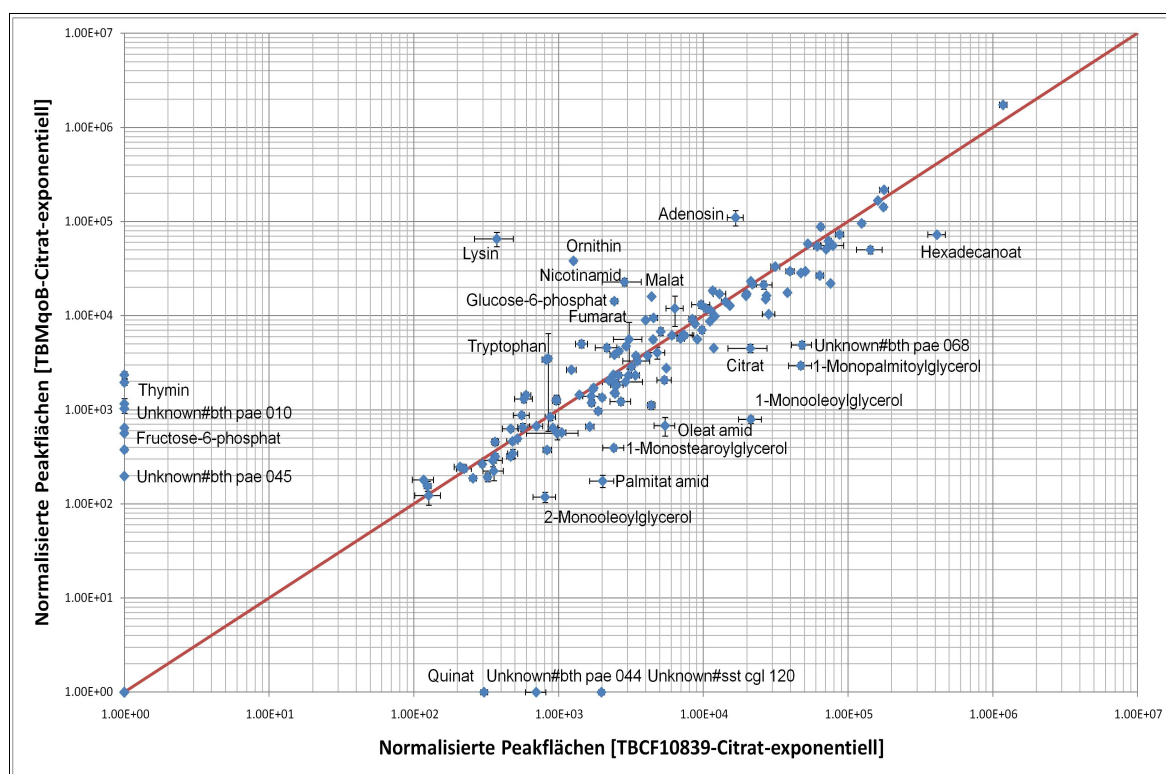


Abb. 66. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA4640, verglichen mit TBCF10839 auf Citrat in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

3.2.3.6 Succinat

Die Konvertierung von Succinat, Komponente des Zitronensäurezyklus, erfolgt über Malat und Pyruvat, um glycolytische Metabolite via Gluconeogenese, Pentosephosphatweg sowie ED-Weg zu generieren. In Abbildung 67 (Tab. 66; S.243-244) wird der Vergleich von TM PA5349 mit TBCF10839 in der exponentiellen Wachstumsphase auf Succinat unter Verwendung eines Streudiagramms detaillierter analysiert.

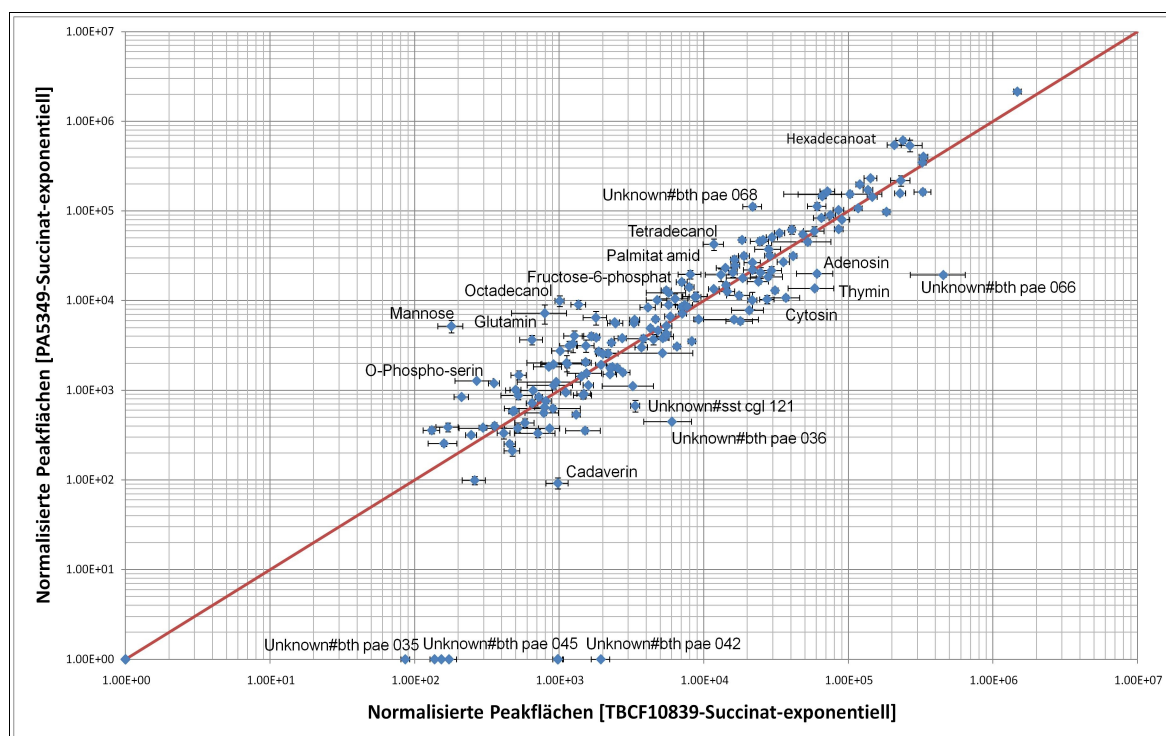


Abb. 67. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Succinat in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Das Metabolom auf Succinat der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 in der exponentiellen Wachstumsphase, reflektiert eine signifikante Akkumulation der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (Octadecanol, Tetradecanol, Hexadecanoat, 1-Monpalmitoylglycerol, 2-Monooleoylglycerol, Palmitat amid).

Dies könnte durch die Transposonintegration in PA5349, die eine Inaktivierung der Rubredoxin-Reduktase zur Folge hat, hervorgerufen worden sein. Die Rubredoxin-Reduktase reguliert die Degradation von Alkanen zu Fettsäuren via Alkoholen sowie Aldehyden und ist im Fettsäure-Metabolismus lokalisiert. Die Akkumulation der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus könnten folglich in Relation mit dem Defizit in der Umsetzung langkettiger Fettsäuren (Wiehlmann, 2001; Hagelueken et al., 2007) und mit der Produktion der Membranlipide stehen.

Im Gegensatz dazu liegen in der TM PA5349 verstärkt Nukleotidbasen (Thymin, Cytosin, Adenosin) in verminderten Konzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase vor und könnten im Kontext mit der Nukleinsäure-Degradation stehen. Purine und Pyrimidine können über den Wiedergewinnungs (*salvage*)-Stoffwechselweg (Wiederverwertungsprozess) recycelt werden und können erneut als Bestandteile von Cofaktoren (NAD⁺, FAD, CoA) fungieren oder der Energiegewinnung in Form von ATP zur Verfügung stehen. Dies könnte eine Reduktion des Energie-Metabolismus in der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839, bei Wachstum auf Succinat darstellen. Der verringerte Cadaverin-Pool in der TM PA5349 könnte eine geminderte Stressantwort auf die Sauerstofflimitierung im exponentiellen Wachstum sowie eine geringere Virulenz andeuten.

In der stationären Wachstumsphase werden die Charakteristika der TM PA5349 sowie des Referenzstammes TBCF10839 auf Metabolom- sowie Transkriptomenebene miteinander verglichen. Die Auswertung der Microarray-Daten wurde mittels des in Kap. 2.9.2 sowie 2.7.1.2 hinterlegten Protokolls durchgeführt und die Ergebnisse in den Tabellen 39 und 40 aufgelistet. Die Tabellen liefern eine Übersicht über die Gen-ID-Nummer, den Gen-Namen, den Produktnamen bzw. die Funktion des Enzyms, ferner die KEGG-ID sowie den Faktor, der sich infolge der Division der Genexpressionsdaten von TM PA5349 durch TBCF10839 ergab. Zeigte die Datenbanksuche verschiedene Enzyme für eine Gen-ID-Nummer an, wurde der Eintrag mit der höchsten Anzahl an Hits (Relevanz) selektiert. Die Gene, die in TM PA5349, verglichen mit dem TBCF10839, auf Succinat verstärkt exprimiert werden, sind in der Tabelle 29 und die in TBCF10839, verglichen mit TM PA5349, verstärkt exprimierten Gene werden in Tabelle 30 aufgeführt.

Bei Betrachtung der Metabolom- (Abb. 68; Tab. 67; S.244-245) sowie Transkriptomdaten (Tab. 29) der TM PA5349 in Bezug auf den Referenzstamm TBCF10839 unter Verwendung von Succinat im stationären Wachstum ist auffällig: einerseits auf Metabolomebene die größtenteils reduziert vorliegenden Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (1-Monoleoylglycerol, 2-Monoleoylglycerol, 1-Monopalmitoylglycerol, Ethanolamin, Phosphoethanolamin, Palmitat amid), andererseits auf Transkriptomenebene die verstärkt induzierte *AcsA*, die den Abbau von Acetat unter ATP-Verbrauch zu Acetyl-CoA reguliert.

Zusätzlich werden in der TM PA5349 die *gcdH* sowie die Acyl-CoA-Dehydrogenase, die beim Katabolismus von Fettsäuren zu Acetyl-CoA beteiligt sind, verstärkt exprimiert. Ferner weisen die Gene *mmsAB*, die für eine Methylmalonat Semialdehyd Dehydrogenase und 3-Hydroxyisobutyrat Dehydrogenase kodieren, eine erhöhte Induktion auf.

MmsAB synthetisieren unter CoA- und NAD⁺-Verbrauch Propanoyl-CoA (Propanoat-Metabolismus). Letzteres kann via vier bzw. fünf enzymatische Reaktionen zu Succinat bzw. Succinyl-CoA konvertiert und in den Zitronensäurezyklus eingespeist werden. Außerdem liegt die Acyl-CoA Thiolase ([EC 6.2.1.1]) in der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839, induziert vor, die aus Acetoacetyl-CoA zwei Acetyl-CoA generiert.

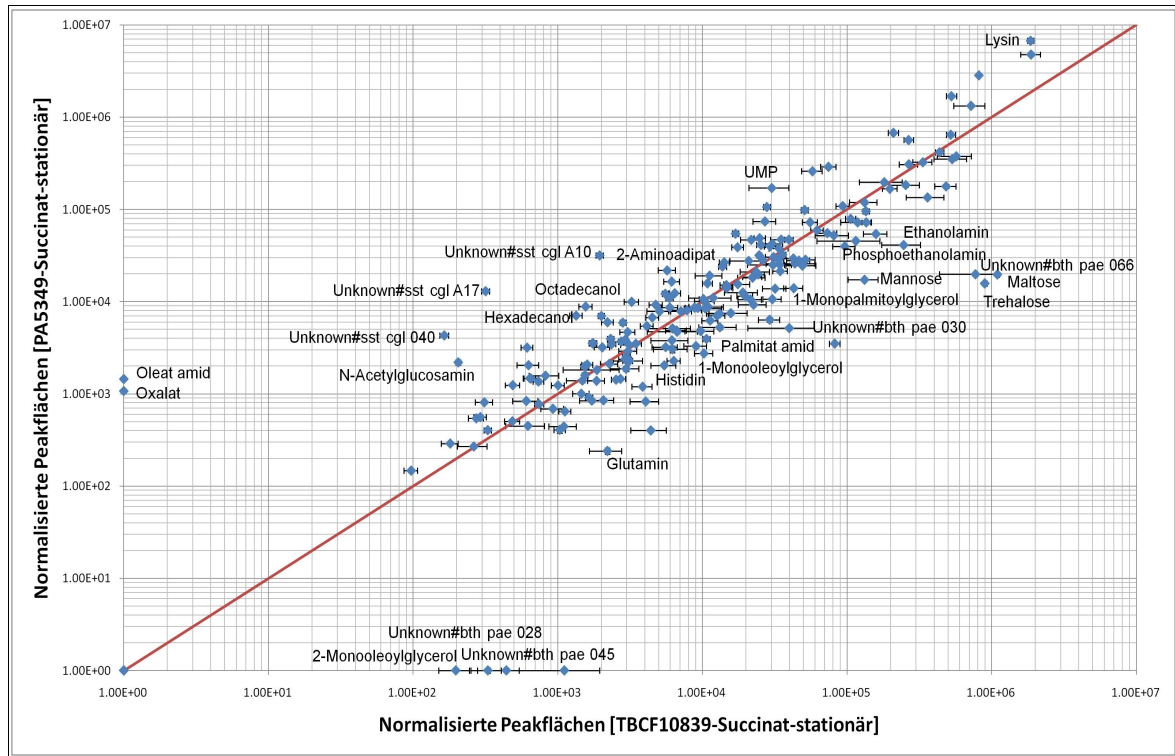


Abb. 68. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Succinat in der stationären Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Tab. 29. Erhöhte Genexpression der *P. aeruginosa* TM PA5349 im Bezug auf den Stamm TBCF10839 während des stationären Wachstums auf Succinat.

Gen ID	Gen-Name	Produktname/ Funktion	Enzyme [KEGG-ID]	Faktor PA5349/TBCF10839
PA0887	<i>acsA</i>	AcetylCoA-Synthase	[6.2.1.1]	25.6
PA2634	<i>aceA</i>	Isocitrat Lyase	[4.1.3.1]	17.4
PA3570	<i>mmsA</i>	Methylmalonat Semialdehyd Dehydrogenase	[1.2.1.27]	11.7
PA3569	<i>mmsB</i>	3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase	[1.1.1.31]	11.6
PA3584	<i>glpD</i>	Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase	[1.1.99.5]	7.6
PA5445		vermutlich Coenzym A Transferase	[3.1.2.1]	7.2
PA1985	<i>pqqA</i>	Pyrroloquinoline Quinone Biosynthese Protein A		6.8
PA0998	<i>pqsC</i>	Homolog zu <i>beta-keto-acyl-acyl-carrier</i> protein synthase	[2.3.1.41]	5.2
PA0997	<i>pqsB</i>	Homolog zu <i>beta-keto-acyl-acyl-carrier</i> protein synthase	[2.3.1.41]	5

Gen ID	Gen-Name	Produktname/ Funktion	Enzyme [KEGG-ID]	Faktor PA5349/TBCF10839
PA0999	<i>pqsD</i>	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase III	[2.3.1.41]	4.8
PA3568		vermutlich Acetyl-CoA Synthase	[6.2.1.1]	4.7
PA1000	<i>pqsE</i>	Quinolone Signalantwort Protein	[3.1.2.6]	4.2
PA3581	<i>glpF</i>	Glycerol Aufnahme Moderator Protein	[2.7.1.30]	3.9
PA2862	<i>lipA</i>	<i>lactonizing lipase precursor (Triacylglycerol Lipase)</i>	[3.1.1.3]	3.8
PA0996	<i>pqsA</i>	vermutlich Coenzyme A Ligase	[6.2.1.1]	3.8
PA0447	<i>gcdH</i>	Glutaryl-CoA Dehydrogenase	[1.3.99.7]	3.7
PA1001	<i>phnA</i>	Anthranilat Synthase Komponente	[4.1.3.27]	3.4
PA0746		vermutlich Acyl-CoA Dehydrogenase	[1.3.99.3]	3.4
PA0297	<i>spuA</i>	putative Glutamin Amidotransferase	[4.1.3.27]	3.3
PA3710		putative GMC-Typ Oxidoreductase	[1.1.99.1]	3.1
PA0299	<i>spuC</i>	Putrescin Aminotransferase	[2.6.1.62]	3.1
PA0649	<i>trpG</i>	Anthranilat Synthase Komponente II	[4.1.3.27]	3
PA4150		vermutlich Dehydrogenase E1 Komponente	[1.2.4.1]	3
PA2553		putative Acyl-CoA Thiolase	[2.3.1.9]	2.7
PA1002	<i>phnB</i>	Anthranilat Synthase Komponente II	[4.1.3.27]	2.7
PA0482	<i>glcB</i>	Malat Synthase G	[2.3.3.9]	2

Die kombinierte Betrachtung der Metabolom- sowie Transkriptomdaten von TM PA5349, verglichen mit TBCF10839, lässt darauf schließen, dass die TM PA5349 langkettige Acetyl-CoAs via β -Oxidation zu Acetyl-CoA, mittels der Gene *aceA* sowie *glcB* (Miller et al., (2008)), beide auf Transkriptomebene akkumuliert, im Glyoxylat-Weg kondensiert. Die Decarboxylierungsschritte via Isocitrat Dehydrogenase ([EC 1.1.1.42]), folglich die ATP-Produktion des Zitronensäurezyklus, werden vermieden, so dass die Zellen der TM PA5349 einen guten Energiezustand aufweisen müssten. Der Glyoxylat-Weg fließt nachfolgend in die Gluconeogenese, um der Zelle notwendige Kohlenhydrate liefern zu können.

Ergänzend liegt die GlpF, die die Aufnahme von Glycerol aus dem umgebenen Medium reguliert, in der TM PA5349 verstärkt exprimiert vor. Die erhöhte Aufnahme von Glycerol, möglicherweise von den bereits abgestorbenen Zellen, könnte in Relation mit einer erhöhten Fettsäure-Synthese stehen, die der Energiegewinnung in der stationären Wachstumsphase dient.

Komplementär erfolgt in der TM PA5349 die stationäre Akkumulation von *spuC*. SpuC übernimmt die molekulare Funktion einer Adenosylmethionin-8-Amino-7-Oxononanoat Transaminase, die im Biotin-Metabolismus lokalisiert ist und die die Konvertierung von S-Adenosyl-4-Methylthio-2-Oxobutanoat und 7,8-Diaminononanoate zu S-Adenosyl-L-Methionin und 8-Amino-7-Oxononanoat katalysiert. S-Adenosyl-L-Methionin fungiert für

die Cyclopropan-Synthase (PA5546 [EC 2.1.1.79]), via Modifikation der *cis*-Doppelbindung ungesättigter Fettsäuren, als Donor sowie langkettige ungesättigte Fettsäuren (*Phospholipid olefinic fatty acid*) (z.B. Palmitoleat, Oleat) als Akzeptor (Crowfoot & Hunt, 1971; Grogan & Cronan, 1997; Chang & Cronan, 1999). Resultierende Produkte sind S-Adenosyl-L-Homocystein sowie Phospholipid Cyclopropan Fettsäuren. Cyclopropane weisen anhand der Bananenbindung (Wollrab, 2002) - gebogene kovalente Atombindung - eine hohe Stabilität auf und dienen der Stresskompensation (Hungersituationen, pH-Wert-, Temperatur-, toxischer Schock (Weber, et al., 1994; Grogan & Cronan, 1997; Chang & Cronan, 1999)). Drei Cyclopropane, namentlich *cis*-9,10-Methylenhexadecanoat, *cis*-11,12-Methylenoctadecanoat (Trivialname Lactobacillat) sowie *cis*-9,10-Methylenoctadecanoat (Trivialname Dihydrosterulat), dominieren in bakteriellen Membranlipiden.

Anhand der in der vorliegenden Arbeit etablierten Phasenseparation der hydrophoben Metabolite mittels der GC-Q-MS-Methode (vgl. Kap. 3.2.4) konnten zwei (*cis*-9,10-Methylenhexadecanoat, *cis*-9,10-Methylenoctadecanoat) dieser drei dominierenden Cyclopropane sowohl in der TM PA5349 als auch in TBCF10839 in signifikanten Konzentrationen sowohl in der exponentiellen als auch stationären Wachstumsphase detektiert werden. Die Akkumulation der Cyclopropane in der TM PA5349 könnten mit einer signifikant erhöhten Stressantwort, einerseits infolge von Sauerstofflimitation im exponentiellen Wachstum und andererseits infolge von Nahrungslimitation im stationären Wachstum, begründet werden. *Cis*-9,10-Methylenhexadecanoat liegt um Faktor 6 sowie *cis*-9,10-Methylenoctadecanoat um Faktor 15 in der TM PA5349 im exponentiellen Wachstum erhöht vor. Im Gegensatz dazu weisen beide Cyclopropane in der TM PA5349 stationär verminderte Konzentrationen um Faktor 3 bzw. 5 auf, was in Relation mit einer Repression der Cyclopropan-Synthase (PA5546 [EC 2.1.1.79]) (Faktor 0.55) in der TM PA5349 steht.

Ergänzt wird die These der erhöhten Stressantwort in der TM PA5349 mit dem Gen PA3710, das für eine Cholin-Dehydrogenase kodiert und in der TM PA5349 im stationären Wachstum verstärkt exprimiert vorliegt. Es katalysiert die Umsetzung von Cholin zu Betain Aldehyd unter Verwendung des Cofaktors Pyrroloquinolin-Quinon (PQQ). Choline sowie Glycin Betaine lagern sich stabil bei Wachstum auf Succinat als effektive Osmoprotektanten zum Zellschutz in *P. aeruginosa* an (Diab et al., 2006). Die Gene *pqqA* sowie *pqqB* (Coenzym PQQ Biosynthese Protein A & B) weisen ein verstärktes Induktionslevel in der TM PA5349 auf.

Diese Ergebnisse, die Detektion der Cyclopropane in beiden Wachstumsphasen, ferner die verstärkte Expression der Cholin-Dehydrogenase sowie der Gene *pqqAB* im

stationären Wachstum stützen die Hypothese der erhöhten Stressantwort der TM PA5349, wohingegen TBCF10839 lediglich im stationären Wachstum eine Akkumulation der Cyclopropane aufweist (vgl. Kap. 3.2.4).

Die Gene *pqsABCDE* sowie *phnAB* werden in der TM PA5349, verglichen mit der Referenz stationär verstärkt exprimiert und deuten ein aktives QS-System in der TM PA5349 an, das wie folgt begründet werden könnte. In *P. aeruginosa* wurde gezeigt, dass die Produktion von Virulenzfaktoren sowie die Entwicklung von Biofilmen über zwei hierarchisch organisierte QS-Systeme via zwei Acyl-Homoserinlactone aktiviert werden. Dabei fungiert 3O-C₁₂-HSL als Signal des *las*- und C₄-HSL als Signal für das *rhl*-QS-System (Kap. 1.4.2). Komplementär wurde ein drittes bakterielles Signalmolekül, das *Pseudomonas*-Quinolone-Signal (PQS), identifiziert, das partiell die QS-System-abhängigen Gene positiv reguliert (Pesci et al., 1999; Bredenbruch et al., 2006). Das *Pseudomonas*-Quinolone-Signal stellt ein 3-Hydroxy-4-Quinolone mit einer 2-Alkyl-Substitution dar, das via Kondensation von Anthranilat (*phnAB*) mit einer 10-C 3-Keto-Fettsäure synthetisiert wird (Coleman et al., 2008). *Pseudomonas*-Quinolone-Signal kontrolliert die Expression multipler Virulenzfaktoren, wie Pyocyanin, Rhamnolipide und Elastase, in *P. aeruginosa* und agiert als Ligand der PqsR, der wiederum als transkriptioneller Aktivator fungiert und das *pqsABCDE* Operon kontrolliert (Diggle et al., 2006b; Xiao et al., 2006).

Ergänzend weist Cadaverin, ein Polyamin und ein möglicher Virulenz-Indikator (vgl. Kap. 3.2.2.3), in der exponentiellen Wachstumsphase der Succinat-Kultivierung in der TM PA5349 eine signifikant reduzierte Konzentration (11-fach) auf. Im stationären Wachstum hingegen liegt der Wert der Verminderung lediglich bei 2 und kann vernachlässigt werden. Diese Annäherung des Wertes könnte ebenfalls ein aktives QS-System anzeigen.

Dieses metabolische Profil sowie die Expression des *Pseudomonas*-Quinolone-Signal in der TM PA5349 verdeutlicht ein via Succinat aktiviertes, möglicherweise abgeschwächtes QS-System und die akquirierte Fähigkeit, Virulenzfaktoren zu sekretieren. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, durch Zugabe von Succinat zu der TM PA5349, die Proteasesekretion bzw. das QS-System zu regenerieren.

Anschließend werden die Gene, die in TBCF10839, verglichen mit TM PA5349 bei stationärem Wachstum auf Succinat erhöht exprimiert vorliegen (Tab. 30), in Kombination mit dem Metabolom charakterisiert und erklärt.

In der stationären Wachstumsphase des TBCF10839, verglichen mit TM PA5349, auf

Succinat als alleinige Kohlenstoffquelle ist auffällig, dass vermehrt Gene des QS-Systems (*rhlAB*, *lasAB*, *rsaL*, *mexG*, PA3535 [3.4.21.62] (Abb. 10; Abb. 71)) verstärkt induziert vorliegen und eine erhöhte Virulenz des TBCF10839 aufzeigen.

Zudem werden in TBCF10839 im stationären Wachstum die Gene des Operons *tadDCBAZ*, *rcpAC* sowie TypIVb Pili signifikant exprimiert, die als Membranproteine der Motilität, Anhaftung sowie Proteinsekretion des Bakteriums fungieren und ferner zu den Virulenzfaktoren (Ueda et al., 2008) zählen. Diese Gene stehen in direkter Relation mit einer erhöhten Virulenz (Bernard et al., 2009).

Tab. 30. Erhöhte Genexpression des *P. aeruginosa* Stammes TBCF10839 im Bezug auf die TM PA5349 während des stationären Wachstums auf Succinat.

Gen ID	Gen-Name	Produktname/ Funktion	Enzyme [KEGG-ID]	Faktor TBCF10839/PA5349
PA3478	<i>rhlB</i>	Rhamnosyltransferase chain B	[2.4.1.173]	12.2
PA1871	<i>lasA</i>	Protease LasA	[3.4.24.32]	11.2
PA1431	<i>rsaL</i>	Regulatorische Protein RsaL		10.5
PA4299	<i>tadD</i>	TadD		10.4
PA3479	<i>rhlA</i>	Rhamnosyltransferase chain A	[3.4.11.5]	8.7
PA4305	<i>rcpC</i>	RcpC		8.1
PA4306	<i>flp</i>	Typ IVb pilin, Flp		7.9
PA2067		vermutlich Hydrolase	[3.1.3.18]	6.9
PA2587	<i>pqsH</i>	vermutlich FAD-anhängige Monooxygenase	[1.14.13.1]	6.3
PA3535		Vermutlich Serinprotease	[3.4.21.62]	5.4
PA3477	<i>rhlR</i>	Transkriptionsregulator RhlR		5.4
PA4300	<i>tadC</i>	TadC	[4.1.99.2]	5.2
PA4302	<i>tadA</i>	TadA ATPase	[3.6.1.-]	5.1
PA4205	<i>mexG</i>	Hypothetisches Protein		4.7
PA1582	<i>sdhD</i>	Succinat Dehydrogenase (D subunit)	[1.3.99.1]	4.6
PA3724	<i>lasB</i>	Elastase LasB	[3.4.24.26]	4.6
PA4304	<i>rcpA</i>	RcpA		4.5
PA1583	<i>sdhA</i>	Succinat Dehydrogenase (A subunit)	[1.3.99.1]	3.9
PA1585	<i>sucA</i>	2 Oxoglutarat Dehydrogenase (E1 subunit)	[1.2.4.2]	3.8

In TBCF10839 werden *sucA* sowie *sdhAD*, die für die 2-Oxoglutarat Dehydrogenase (E1 Untereinheit) und die Succinat Dehydrogenase (AD Untereinheiten) kodieren, in der stationären Wachstumsphase überexprimiert. SucA und SdhAD, im Zitronensäurezyklus integriert, sind in der Generierung von Vorläufer-Metaboliten der Biosynthese, von Energie in Form von ATP sowie in dem Aminosäure-Metabolismus involviert. Dies zeigt möglicherweise eine effiziente Energiebilanz des TBCF10839 an.

Auf Metabolomebene weisen Intermediate des Fettsäure-Metabolismus in TBCF10839 erhöhte Konzentrationen auf. Deutlich wird eine Akkumulation der Osmolyten und von Histidin, das in direkter Verbindung mit dem Purin-Metabolismus steht, sowie Zucker, die die Vorstufen der Rhamnose darstellen. Die verstärkten Konzentrationen der Vorstufen der Rhamnose können mit der erhöhten Expression von *rhIAB* begründet werden.

Die Kombination der Metabolom- sowie Transkriptomdaten vom Referenzstamm TBCF10839, verglichen mit der TM PA5349, reflektiert bei Wachstum auf Succinat ein aktives QS-System. Ferner könnten die Daten in direkter Relation mit einer effektiven Adaptation an das Medium, einer guten Energiebilanz durch die Induktion der Gene des Zitronensäurezyklus sowie einer effizienten Stresskompensation mittels der erhöhten Osmolyten im Metabolom stehen.

3.2.3.7 Cadaverin

Cadaverin repräsentiert eine nicht favorisierte, langsam metabolisierte Nahrungsquelle. Dies kann mit einer signifikant reduzierten spezifischen Wachstumsrate sowohl der TM D8A6, PA1436, PA1572 sowie PA5349 als auch des Referenzstammes TBCF10839 (Tab. 27) sowie der geringen Induktion unterschiedlicher Stoffwechselwege belegt werden.

Zudem konnte bei Wachstum auf Cadaverin sowohl in der exponentiellen (Tab. 25) als auch in der stationären Wachstumsphase (Tab. 26) eine deutlich reduzierte Anzahl an Metaboliten sowie Metabolitkonzentrationen detektiert werden.

Ein Vergleich der TM PA5349 mit dem TBCF10839 in der exponentiellen (Abb. 69) sowie stationären Wachstumsphase (Abb. 70) hinsichtlich des Metaboloms und Transkriptoms (Tab. 31, 32) (stationär) wird charakterisiert.

Das metabolische Profil in der exponentiellen Wachstumsphase der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839, präsentiert lediglich geringe Varianzen, das im Konsens mit einer hohen Korrelation von 0.967 steht (Tab. 28). Die detektierten Differenzen der TM PA5349 könnten aufgrund der erhöhten Nukleinbasen (Cytosin, Adenosin) (Abb. 69) ein Indiz für eine effiziente Energiebilanz dieser sein, was ferner mit der signifikant reduzierten Verdopplungsrate (Tab. 27) verifiziert werden könnte. Purine und Pyrimidine können über den Wiedergewinnungs (*salvage*)-Stoffwechselweg (Wiederverwertungsprozess) recycelt werden und können erneut als Bestandteile von Cofaktoren (NAD⁺, FAD, CoA) fungieren oder der Energiegewinnung in Form von ATP zur Verfügung stehen.

Allerdings (Abb. 69; Tab. 68; S.245-246)) kann im Metabolom der TM PA5349, verglichen mit dem TBCF10839, eine deutliche Reduktion der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus sowie des Osmolyten bzw. Speicherstoffs Trehalose verzeichnet werden. Dies deutet auf eine verminderte Produktion von Membranlipiden sowie eine reduzierte Stressantwort auf das kationische, hydrophobe Cadaverin in der TM PA5349, hin. Möglicherweise kompensiert die TM PA5349, verglichen mit TBCF10839, über den Wiedergewinnungs (*salvage*)-Stoffwechselweg den Nachteil in der Energieeffizienz.

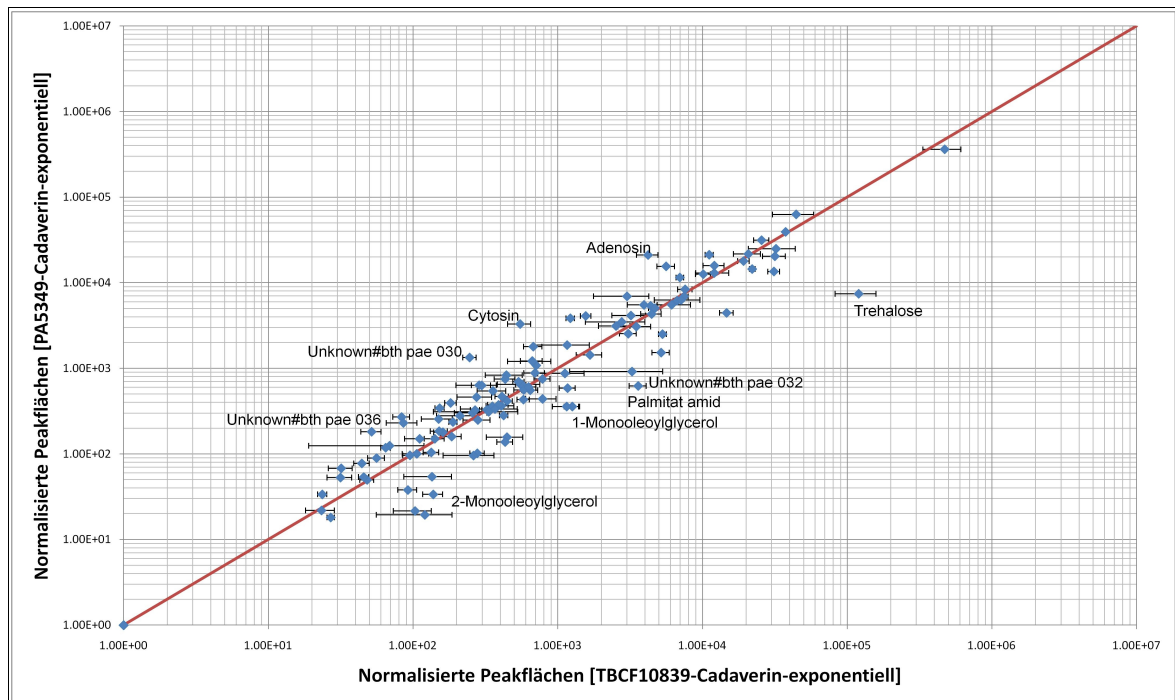


Abb. 69. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Cadaverin in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Bei stationärem Wachstum der TM PA5349 und von TBCF10839 auf Cadaverin (Abb. 70, Tab. 69; S.246-247) wird ein analoges metabolisches Profil der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus aufgezeigt. Dies könnte - entsprechend der exponentiellen Wachstumsphase - in direkter Relation mit einer erhöhten Stressantwort des TBCF10839 stehen. Außerdem liegen in TBCF10839 stationär Zucker sowie deren Phosphate akkumuliert vor.

Im Gegensatz dazu weisen Vorläufer-Metabolite und Intermediate des AHL-Metabolismus, Aminosäuren, Putrescin, ein Polyamin und Urea in der TM PA5349 gestiegene Konzentrationslevel auf, die mit einer geringen Aktivität des QS-Systems (AHL-Metabolismus) sowie mit einer effizienten Stressantwort (Putrescin, Urea) in der TM PA5349 korrelieren.

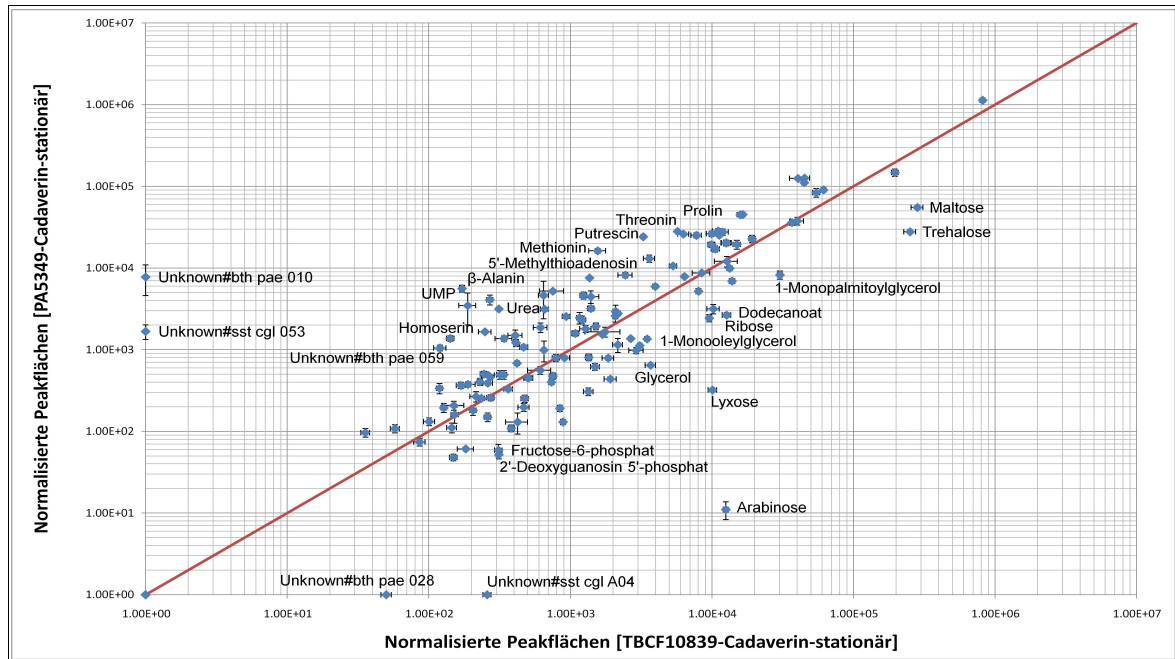


Abb. 70. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 auf Cadaverin in der stationären Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Im Anschluss werden die Gene, die in TM PA5349, verglichen mit dem Referenzstamm TBCF10839, während des stationären Wachstums auf Cadaverin erhöht exprimiert vorliegen (Tab. 31), in Kombination mit dem Metabolom, charakterisiert und erklärt.

Tab. 31. Erhöhte Genexpression der *P. aeruginosa* TM PA5349 im Bezug auf den TBCF10839 während des stationären Wachstums auf Cadaverin.

Gen ID	Gen-Name	Produktname/ Funktion	Enzyme [KEGG-ID]	Faktor PA5349/TBCF10839
PA1927	<i>metE</i>	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamat-Homocystein S-Methyltransferase	[2.1.1.14]	11.6
PA2016	<i>liuR</i>	Regulator der <i>liu</i> Gene		3.4
PA2015	<i>liuA</i>	putative Isovaleryl-CoA Dehydrogenase	[1.3.99.10]	3.2
PA2014	<i>liuB</i>	Methylcrotonyl-CoA Carboxylase, beta-subunit	[6.4.1.4]	3.1
PA0796	<i>prpB</i>	Carboxyphosphoenolpyruvat Phosphonomutase	[4.1.3.30]	2.8
PA4552	<i>pilW</i>	Typ4 Fimbrial Biogenese Protein PilW		2.5
PA4687	<i>hitA</i>	Eisen bindendes periplasmatisches Protein HitA		2.5
PA4550	<i>fimU</i>	Typ4 Fimbrial Biogenese Protein FimU		2.4
PA2013	<i>liuC</i>	putative 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase	[4.2.1.17]	2.4
PA0795	<i>prpC</i>	Citrat Synthase 2	[2.3.3.5]	2.3
PA2624	<i>idh</i>	Isocitrat Dehydrogenase	[1.1.1.42]	2.3
PA3587	<i>metR</i>	Transkriptionsregulator MetR		2.3
PA0899	<i>aruB</i>	Succinylarginin Dihydrolase	[3.5.3.23]	2.2

Gen ID	Gen-Name	Produktname/ Funktion	Enzyme [KEGG-ID]	Faktor PA5349/TBCF10839
PA0898	<i>aruD</i>	Succinylglutamate 5-Semialdehyd Dehydrogenase	[1.2.1.71]	2.2
PA0546	<i>metK</i>	Methionin-Adenosyltransferase	[2.5.1.6]	2.2
PA0896	<i>aruF</i>	Arginin/Ornithin Succinyltransferase AI subunit	[2.3.1.109]	2.1
PA0897	<i>aruG</i>	Arginin/Ornithin Succinyltransferase AII subunit	[2.3.1.109]	2.1
PA4221	<i>fptA</i>	Fe(III)-Pyochelin Äußere Membran Receptor Precursor		2.1
PA0893	<i>argR</i>	Transkriptionsregulator		2.1
PA2011	<i>liuE</i>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase	[4.1.3.4]	2.1
PA0901	<i>aruE</i>	Succinylglutamat Desuccinylase	[3.5.1.96]	2.1

Unter Berücksichtigung des Transkriptoms in der stationären Wachstumsphase wird eine deutliche Expression der Gene *metE*, *metK* sowie *metR* in der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839, aufgezeigt, was mit den Metabolomdaten der entsprechenden Wachstumsphase – Akkumulation von Methionin, Homoserin, 5'-Methylthioadenosin, korreliert. Der Transkriptionsregulator MetR von *P. aeruginosa* weist eine 63%ige Homologie zu *metR* in *E. coli*, ein Regulator der Methionin-Biosynthese, auf. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Yeung et al. (2009) wurde an *P. aeruginosa* Schwärm-defizienten Mutanten gezeigt, dass die Schwärm- sowie *Twitching*-Motilität mittels des Gens *metR* kontrolliert werden könnte. Zusätzlich liegen im Transkriptom der TM PA5349 auf Cadaverin die Gene *pilW* und *fimU*, involviert in der Biogenese sowie der mechanischen Funktion von TypIV Pili, verstärkt vor. Die erhöhte Expression dieser Gene steht in direkter Relation mit der Expression von *hitA*, wie in Studien von Deziel et al., (2003) und Singh et al., (2002) gezeigt wurde. Infolge eines geringen Eisenlevels in der Umgebung, gleichzusetzen mit einem nicht-favorisierten Medium, in diesem Falle Cadaverin, wird die Schwärm-Motilität stimuliert, somit die Biotensid-Produktion und Oberflächen-Motilität verstärkt induziert, um *P. aeruginosa* vor der Sedimentation in den Biofilm zu bewahren (Deziel et al., 2003). Zusätzlich ist *hitA* essentiell für das bakterielle Wachstum und eine bedeutende Determinante bakterieller Virulenz (Adhikari et al., 1995).

Die Gene *liuRABCDE* des *liu* (*leucin/isovalerate utilisation*)- Genclusters in TM PA5349 werden verstärkt induziert. Das Gencluster enthält fünf Strukturgene und ein Regulator-Gen, *liuR* (Höschle et al., 2005; Förster-Fromme et al., 2006). Das Gencluster kodiert für den Katabolismus Methyl-verzweigter Komponenten (Leucin, Valin, Isoleucin-Degradation) (Förster-Fromme & Jendrosseck, 2008) sowie für den Propanoat-Metabolismus, in dem die Expression der Gene *prpB*, *prpC* erhöht in der TM PA5349 vorliegen. Mittels der 2-Methylisocitrat Lyase (*prpB*) werden Pyruvat und Succinat, Intermediate der Gluconeogenese sowie des Zitronensäurezyklus generiert. Anschließend kann mittels

SucC ([EC 6.2.1.5]) Succinyl-CoA gebildet werden, das als Cofaktor in dem Arginin-Succinyltransferase (AST) Stoffwechselweg agiert. Letzterer stellt den fundamentalen Arginin und Ornithin Stoffwechselweg (*aru* - *arginine and ornithine utilisation*) unter aeroben Bedingungen in *P. aeruginosa* dar. Dieser enthält fünf Arginin-katabolische Enzyme, die von den Genen *aruABCDE* (Cunin et al., 1986; Haas et al., 1990) kodiert werden, die ebenfalls verstärkt in der TM PA5349 exprimiert werden. Vor dem *aruCFGDB* Operon ist das verstärkt induzierte regulatorische *argR* Gen vorgelagert und stellt ein Mitglied eines weiteren Operons, das für Arginin-Transportgene kodiert, dar (Itoh, 1997). Der AST-Stoffwechselweg konvertiert unter analoger Freisetzung von Ammonium und Kohlenstoffdioxid Arginin zu Succinat und L-Glutamat. Infolge der Generierung von Glutamat können Aminosäuren neu synthetisiert werden und als Bausteine von Peptiden und Proteinen fungieren. Eine signifikante Akkumulation von Aminosäuren in der TM PA5349 ist im Metabolom (Abb. 70) angezeigt. Außerdem liegt das Gen *idh* erhöht exprimiert vor, das einen verstärkten Fluss durch den Zitronensäurezyklus verdeutlicht und die Bildung von Reduktionsäquivalenten zur Folge hat.

Dieses Profil der TM PA5349 auf Metabolom- sowie Transkriptomebene lässt auf eine weitläufige Induktion der Proteinbiosynthese schließen, begonnen in der exponentiellen Wachstumsphase mit der Akkumulation von Adenosin und Cytosin. Die Nahrungsquelle Cadaverin reflektiert für die TM PA5349 einen erhöhten Stressfaktor, der die Überexpression der Motilitätsgene bedingt, um eine Sedimentation in den Biofilm zu kompensieren. Möglicherweise könnte die verstärkte Expression der Gene *metE*, *metK* sowie *metR* des AHL-Metabolismus auf Transkriptomebene sowie die Anreicherung von Homoserin, Methionin und 5'-Methylthioadenosin auf Metabolomebene ein Indiz für ein durch Cadaverin regeneriertes aktives, jedoch abgeschwächtes QS-System der TM PA5349, verglichen mit der Referenz, sein.

Die Ergebnisse der Expression des AHL-Metabolismus und ein möglicherweise dadurch bedingt aktives QS-System (Heurlier et al., 2006) widerspricht der Aussage, dass durch Cadaverin die Proteasesekretion in der TM PA5349 nicht regeneriert werden könnte. Allerdings wurde gezeigt, dass bei einer 10mM sowie 20mM Konzentration von Cadaverin, eine Proteasesekretion beobachtet werden konnte. In der Arbeit wurde eine 5mM Konzentration von Cadaverin verwendet, bei der keine Proteasesekretion gezeigt werden konnte (persönliche Mitteilung von Frau Sonja Horatzek). Möglicherweise ist die *P. aeruginosa* TM PA5349 in der Lage, durch längere Inkubation auf dem Medium (Beginn stationäres Wachstum nach 14 Stunden (TM) sowie 30 Stunden (TBCF10839)), den AHL-Metabolismus und folglich die Proteasesekretion zu induzieren.

Diese Hypothese müsste allerdings durch weitere Experimente verifiziert werden.

Anschließend werden die Gene, die in der Referenz, verglichen mit der TM PA5349, während des stationären Wachstums auf Cadaverin erhöht induziert vorliegen (Tab. 32), in Kombination mit dem Metabolom analysiert und erläutert.

Tab. 32. Erhöhte Genexpression des *P. aeruginosa* Stammes TBCF10839 im Bezug auf die TM PA5349 während des stationären Wachstums auf Cadaverin.

Gen ID	Gen-Name	Produktname/ Funktion	Enzyme [KEGG-ID]	Faktor TBCF10839/PA5349
PA1431	<i>rsaL</i>	Regulatorisches Protein RsaL		41.1
PA2570	<i>pa1L</i>	LecA PA-I <i>galactophilic lectin</i>		24.8
PA2939	<i>pepB</i>	vermutlich Aminopeptidase	[3.4.11.15]	21.1
PA3690		vermutlich Metall-Transport P-Typ ATPase	[3.6.3.3]	19.6
PA3479	<i>rhIA</i>	Rhamnosyltransferase chain A	[3.4.11.5]	18.6
PA3333	<i>fabH2</i>	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase III	[2.3.1.41]	16.2
PA3478	<i>rhIB</i>	Rhamnosyltransferase chain B	[2.4.1.173]	15.3
PA1869		vermutlich Acyl Carrier Protein		15
PA2165		vermutlich Glycogen Synthase	[2.4.1.21]	14
PA0090	<i>clpV1</i>	ClpV1 (Chaperon & Hitzeschockprotein (Hsp))	[3.4.21.92]	13.7
PA3724	<i>lasB</i>	Elastase LasB	[3.4.24.26]	13.7
PA1905	<i>phzG2</i>	vermutlich Pyridoxamin 5'-phosphat Oxidase		10.3
PA2142		vermutlich <i>short-chain dehydrogenase</i>	[1.1.1.100]	10.1
PA4211	<i>phzB1</i>	vermutlich Phenazin Biosynthese Protein		9.3
PA1432	<i>lasI</i>	Autoinducer Synthase Protein LasI	[2.3.1.184]	9.1
PA1784		hypothetisches Protein (40% Homologie zur Alginat Lyase (<i>Klebsiella pneumoniae</i>))	[4.2.2.3]	8.8
PA2144	<i>glgP</i>	Glycogen Phosphorylase	[2.4.1.1]	8.5
PA2160		vermutlich Glycosyl Hydrolase	[3.2.1.68]	8.1
PA1871	<i>lasA</i>	LasA Protease Precursor	[3.4.24.32]	7.8
PA3126	<i>ibpA</i>	Hsp IbpA		6.9
PA1904	<i>phzF2</i>	vermutlich Phenazin Biosynthese Protein	[5.1.-.-]	6.7
PA2152		vermutlich Trehalose Synthase	[5.4.99.16]	6.4
PA2159		konserviertes hypothetisches Protein (62% Homologie zum hypothetischen yhcV Genprodukt von <i>Bacillus subtilis</i>)	[1.1.1.205]	6.1
PA4385	<i>groEL</i>	GroEL Protein (60 kD Chaperonin)		5.4
PA0852	<i>cpbD</i>	Chitin-binde Protein CbpD Precursor	[3.2.1.14]	5.1
PA1903	<i>phzE2</i>	Phenazin Biosynthese Protein PhzE	[4.1.3.27]	5.1
PA2416	<i>treA</i>	Periplasmischer Trehalase Precursor	[3.2.1.28]	5.1
PA2163		Hypothetisches Protein (4-alpha-glucanotransferase activity)	[2.4.1.25]	5
PA1078	<i>flgC</i>	Flagellar Basalkörper „rod“ Protein FlgC		4.9

Gen ID	Gen-Name	Produktname/ Funktion	Enzyme [KEGG-ID]	Faktor TBCF10839/PA5349
PA5351	<i>rubA1</i>	Rubredoxin 1	[1.14.15.3]	4.7
PA4762	<i>grpE</i>	Hsp GrpE (Hsp24)	[1.17.4.2]	4.6
PA1001	<i>phnA</i>	Anthranilat Synthase Komponente I	[4.1.3.27]	4.5
PA0879		vermutlich Acyl-CoA Dehydrogenase	[1.3.99.3]	4.3
PA4386	<i>groES</i>	GroES Protein (10 kD Chaperonin)		4.2
PA2153	<i>glgB</i>	1,4-alpha-Glucan branching Enzym	[2.4.1.18]	4.1
PA3477	<i>rhIR</i>	Transkriptionsregulator RhIR		4
PA1901	<i>phzC2</i>	Phenazin Biosynthese Protein PhzC	[2.5.1.54]	4
PA5054	<i>hslU</i>	Hsp HsiU	[3.4.25.-]	3.9
PA4761	<i>dnaK</i>	dnaK Protein (Hsp70)	[1.3.1.74]	3.9
PA0085	<i>hcp1</i>	Hcp1		3.9
PA2862	<i>lipA</i>	<i>lactonizing lipase precursor (Triacylglycerol Lipase)</i>	[3.1.1.3]	3.8
PA0059	<i>osmC</i>	Osmotisch induziertes Protein OsmC	[1.11.1.15]	3.7
PA5053	<i>hslV</i>	Hsp HslV	[3.4.23.43]	3.6
PA1077	<i>flgB</i>	Flagellar Basalkörper „rod“ Protein FlgB		3.6
PA1249	<i>aprA</i>	Alkalische Metalloproteinase Precursor	[3.4.24.40]	3.4
PA4760	<i>dnaJ</i>	dnaJ Protein (Hsp DnaJ)	[2.4.2.7]	3.2

Die Betrachtung der in Tabelle 32 aufgeführten Gene zeigt einen deutlichen Kontrast in der Anzahl verstärkt exprimierter Gene in TBCF10839 im Vergleich zu den erhöht exprimierten Genen in der TM PA5349 in der stationären Wachstumsphase auf Cadaverin.

Die Analyse des Transkriptoms des TBCF10839 auf Cadaverin im Vergleich zu der TM PA5349 zeigt eine fokussierte Expression QS-spezifischer Komponenten, die in Abbildung 71 in einem Modell von Matthew et al., (2000) visualisiert sind.

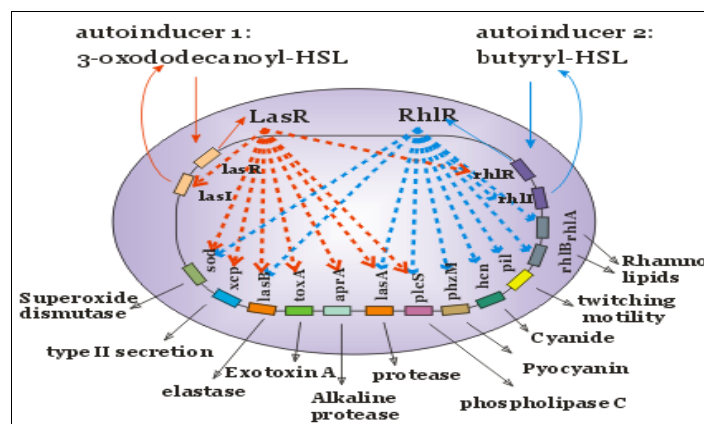


Abb. 71. Modell des Quorum Sensing - Regulationsnetzwerkes in *P. aeruginosa*
<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm> (Reproduziert nach: Matthew et al., 2000).

Vorwiegend werden in TBCF10839, verglichen mit TM PA5349, die Gene, die in dem QS-System, der Antibiotika-Resistenz, den Chaperonen sowie Hitze-Schock-Proteinen, der Motilität, Anheftung, der Adaptation sowie Protektion gegen osmotischen Stress involviert sind, verstärkt induziert und stehen in direkter Relation mit einem auf Cadaverin aktiven QS-System, einer effizienten Adaptation sowie osmotischen Protektion des Referenzstammes. Auffallend ist die deutliche Expression der im Stärke- & Sucrose- sowie Fructose- & Mannose-Metabolismus beteiligten Enzyme und Gene (*rhIAB*, *rhIR*, *glgP*, *glgB*, PA2152, PA2165), was auf eine erhöhte Rhamnolipidproduktion hinweisen könnte. Zudem werden die Enzyme des Fettsäure-Metabolismus (PA1869, PA0879) verstärkt exprimiert. Die in der stationären Wachstumsphase in TBCF10839 detektierte Anreicherung der Enzyme, die für den Fettsäure-Metabolismus kodieren, offenbart ein simultanes Verhalten zu den verstärkt nachgewiesenen Metaboliten im TBCF10839 in der relevanten Wachstumsphase (Abb. 70).

3.2.4 Etablierung der Extraktionsmethode der hydrophoben Phasenseparation an *P. aeruginosa*

Basierend auf der Diplomarbeit von Elstermann (2002) sowie der Dissertation von Strelkov (2004), in denen die chemisch-massenspektrometrische Identifizierung hydrophober Metabolite von *Corynebacterium glutamicum* (Elstermann, 2002) sowie die Entwicklung und Anwendung einer Methode zur Metabolomanalyse von *Corynebacterium glutamicum* (Strelkov, 2004) analysiert wurden, sollten in dieser Arbeit die für *C. glutamicum* etablierten Extraktionsmethoden hydrophober Metabolite auf *P. aeruginosa* angewendet werden. Obgleich es sich bei *C. glutamicum* um ein Gram-positives Bakterium handelt, kam die für diesen Organismus etablierte Bibliothek für *P. aeruginosa*, ein Gram-negativer Organismus zum Einsatz.

Für die Methodenetablierung sowie die sich anschließende Analyse der hydrophoben Metabolite wurde Succinat als alleinige Kohlenstoffquelle und der Referenzstamm TBCF10839 von *P. aeruginosa* verwendet. Abbildung 72 stellt das Ergebnis der drei Extraktionsmethoden, die in Fließschemata in Kapitel 2.5.3.2 sowie 2.5.4.2 detailliert gezeigt sind, dar. Der Übersichtlichkeit halber werden die Metabolitkonzentrationen logarithmisch aufgetragen (Abb. 72) und die detektierten Metabolite mit Zahlen von 1 - 19 markiert. In Tabelle 33 sind die in der Abbildung 72 mit Zahlen gekennzeichneten Metabolite aufgeführt.

Der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen liegt für die Replikate der Extraktionsmethode 1 bei 5.1%, der Extraktionsmethode 2 bei 10.9% und der Extraktionsmethode 3 bei 7.3%. Die Analyse der detektierten Metabolite während der hydrophoben Phasenseparation (Abb. 72, Tab. 33) zeigt, dass annähernd alle Metabolite in der Extraktionsmethode 1 und 3, verglichen mit der Extraktionsmethode 2, deutlich reduzierte Konzentrationen aufwiesen. Obwohl sich ein höherer relativer Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen ergab und der Zeitaufwand größer war, wurde dennoch die Extraktionsmethode 2 selektiert und in der vorliegenden Arbeit angewendet.

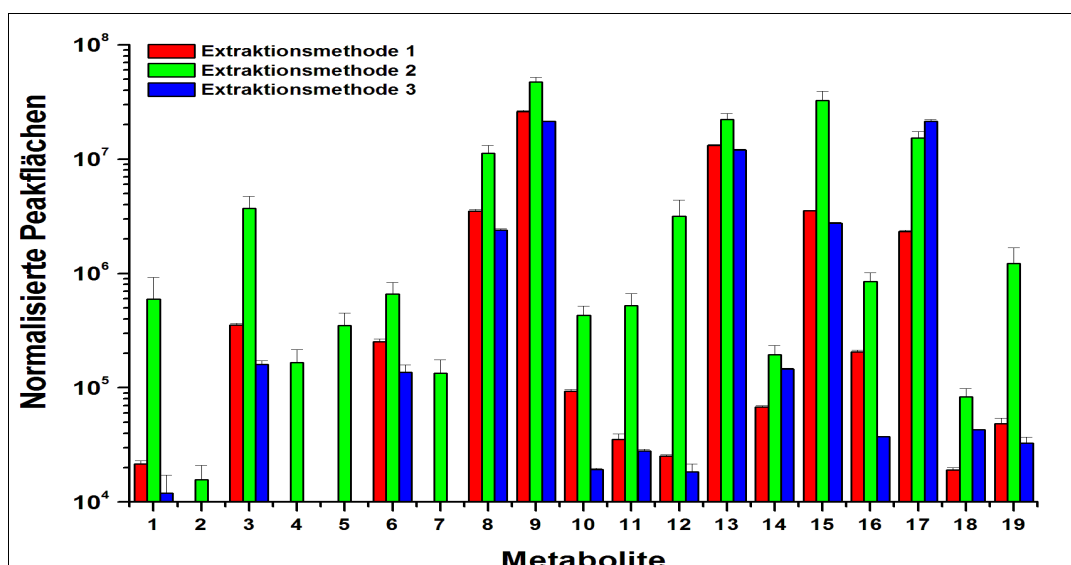


Abb. 72. Vergleich der drei Extraktionsmethoden der hydrophoben Phasenseparation in TBCF10839. Die Zahlen 1 - 19 stellen detektierte Metabolite (vgl. Tab. 43) dar.

Tab. 33. Detektierte Metabolite, die relativen Konzentrationen sowie der Standardfehler der hydrophoben Phasenseparation der Extraktionsmethoden 1 - 3

Metabolite	Extraktionsmethode 1		Extraktionsmethode 2		Extraktionsmethode 3	
	Rel. Konzentrationen	Standardfehler 1	Rel. Konzentrationen	Standardfehler 2	Rel. Konzentrationen	Standardfehler 3
1. Dodecanoat	21613	± 6	595070	± 24	11990	± 43
2. Tridecanoat	2175	± 13	15760	± 14	845	± 1
3. Tetradecanoat	354261	± 4	3700000	± 12	160329	± 8
4. 13-Methyltetradecanoat	2594	± 3	165456	± 13	1004	± 8
5. 12-Methyltetradecanoat	7860	± 10	350562	± 12	4072	± 3
6. Pentadecanoat	253788	± 5	658216	± 11	137114	± 15
7. 14-Methyltetradecanoat	6238	± 3	134160	± 13	3650	± 10
8. cis-9-Hexadecanoat	3513333	± 4	11216666	± 7	2400000	± 2
9. Hexadecanoat	26033333	± 2	47200000	± 4	21366666	± 1
10. cis-9,10-Methylenhexadecanoat	9338	± 3	429723	± 9	19324	± 2

Metabolite	Extraktionsmethode 1		Extraktionsmethode 2		Extraktionsmethode 3	
	Rel. Konzen- trationen	Standard- fehler	Rel. Konzen- trationen	Standard- fehler	Rel. Konzen- trationen	Standard- fehler
11. Heptadecanoat	35202	± 12	525158	± 12	27996	± 3
12. cis-9-Octadecanoat	25355	± 3	3160000	± 17	18431	± 16
13. trans-9-Octadecanoat	13200000	± 2	22300000	± 5	11966666	± 2
14. 2-Hydroxyhexadecanoat	67569	± 3	194361	± 9	145646	± 2
15. Octadecanoat	3533333	± 1	32633333	± 8	2760000	± 1
16. cis-9,10-Methylenoctadecanoat	206388	± 4	850305	± 8	37313	± 1
17. Nonadecanoat	2333333	± 2	15266666	± 6	2133333	± 4
18. 2-Hydroxyoctadecanoat	19141	± 4	83088	± 8	43066	± 1
19. Eicosanoat	48405	± 12	1227679	± 16	32695	± 13

3.2.4.1 Vergleich hydrophober Metabolite der TM PA5349 mit dem TBCF10839

Nach der Etablierung der Extraktionsmethode der hydrophoben Phasenseparation sollte eine der vier TM mit dem TBCF10839 verglichen werden. Die TM PA5349 zeigt bereits im metabolischen Profil unter Verwendung der Kohlenstoffquelle Succinat sowohl in der exponentiellen als auch stationären Wachstumsphase Differenzen im Fettsäure-Metabolismus (Kap. 3.2.3.6) sowie ein analoges metabolisches Verhalten zu den anderen TM auf. Ferner wurden im Zuge dieser Arbeit Transkriptomdaten der TM PA5349 sowie des Referenzstammes TBCF10839 der stationären Wachstumsphase auf Succinat erstellt.

In den zwei analysierten Wachstumsphasen konnten in beiden Organismen lediglich 19 der 54 Metabolite umfassenden hydrophoben Bibliothek detektiert werden. Davon beschreiben bereits 11 der 54 in der Bibliothek integrierten Metabolite Mycolsäuren und sind *Corynebacterium*-spezifisch. Vier der sich im Chromatogramm rein optisch unterscheidenden Substanzen, die nicht in der hydrophoben Bibliothek enthalten sind, können anhand der NIST (*National Institute of Standards and Technology*) Bibliothek identifiziert, jedoch nicht quantifiziert werden. Bei diesen Ausnahmen handelt es sich um die mit den Kleinbuchstaben (a, d, e, f) in Abbildung 73 markierten Substanzen:

a (Benzoat-Derivat), d (9-Octadecenamid), e (Oleamid) sowie f (Galactopyranosid-Derivat) mit einer prozentualen Wahrscheinlichkeit (NIST-Angaben) von 70% (a, d), 93% (e) sowie 32% (f). Letzteres konnte von NIST nur mit einer sehr geringen prozentualen Wahrscheinlichkeit angegeben werden und wird daher im Weiteren vernachlässigt.

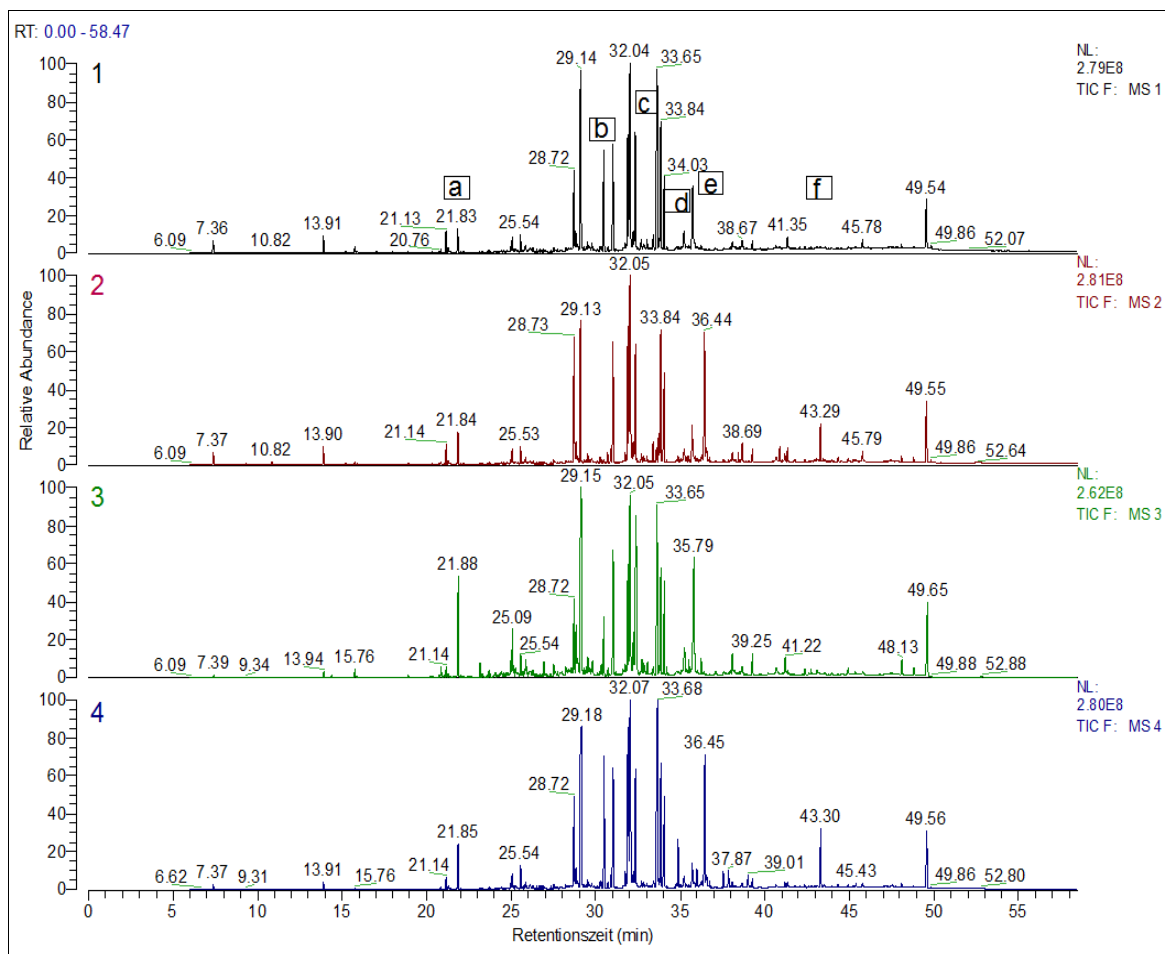


Abb. 73. Vergleich der Chromatogramme der hydrophoben Phasenextraktion der TM PA5349 sowie TBCF10839 in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase unter Verwendung von Succinat (1 = TM PA5349-exp. (schwarz); 2 = TBCF10839-exp. (rot); 3 = PA5349-stat. (grün); 4 = TBCF10839 stat.(blau)). Die Kleinbuchstaben a - f markieren signifikant veränderte Metabolite.

Im Anschluss werden die signifikanten Differenzen innerhalb der Organismen und der Wachstumsphasen zunächst anhand einer PCA (Abb. 74) dargestellt und folgend detaillierter beschrieben.

Die PCA in Abbildung 74 verdeutlicht eine hohe Analogie der Organismen in der exponentiellen Wachstumsphase (1 und 2), verifiziert anhand der kalkulierten Korrelation von 0.983. Konträr dazu weist die Korrelation der stationären Wachstumsphase beider Organismen einen Wert von 0.9 auf, der größere Differenzen im Metabolom reflektiert.

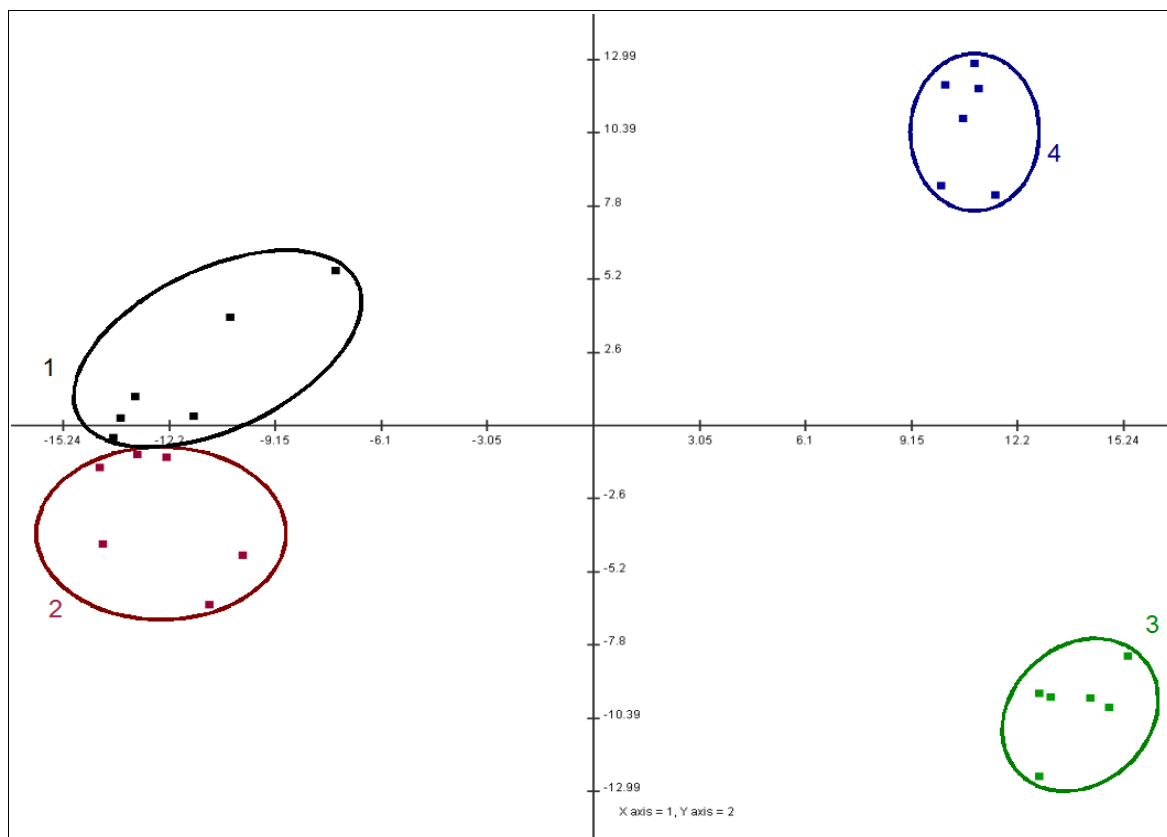


Abb. 74. PCA der hydrophoben Phasenseparation der TM PA5349 und des TB CF10839 auf Succinat. (1 = TM PA5349-exp. (schwarz); 2 = TBCF10839-exp. (rot); 3 = TM PA5349-stat. (grün); 4 = TBCF10839 stat.(blau)). Die Komponenten 1 und 2 beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 74 %.

Die Ergebnisse der PCA werden abschließend anhand einer T-Test-Analyse (Abb. 75) (vgl. Kap. 2.8.7, Kap. 3.2.6.2) visualisiert und nachfolgend erläutert.

Der T-Test in Abbildung 75 (Tab. 70; S.248) markiert jeweils 7 Wachstumsphasen-unspezifische sowie 3 Wachstumsphasen-spezifische Metabolite. Davon zeigen 6 der 7 unspezifischen Metabolite ein antiparalleles Verhalten auf. In der exponentiellen Wachstumsphase liegen diese Metabolite in erhöhten Konzentrationen vor, wohingegen diese in der stationären Wachstumsphase in reduzierten Konzentrationen in der TM PA5349, verglichen mit dem TBCF10839, detektiert werden.

Auffällig ist eine Anreicherung gesättigter, langkettiger Fettsäuren (Tetradecanoat (C_{14}), 14-Methylpentadecanoat (C_{15}), Heptadecanoat (C_{17}), Octadecanoat (C_{18}), Eicosanoat (C_{20})) in der TM PA5349, verglichen mit dem Referenzstamm TBCF10839, in der stationären Wachstumsphase der Succinat-Kultivierung (Abb. 106). Diese werden alle zu den höheren Alkanen wegen ihrer Kettenlänge von mehr als neun Kohlenstoffatomen, gezählt.

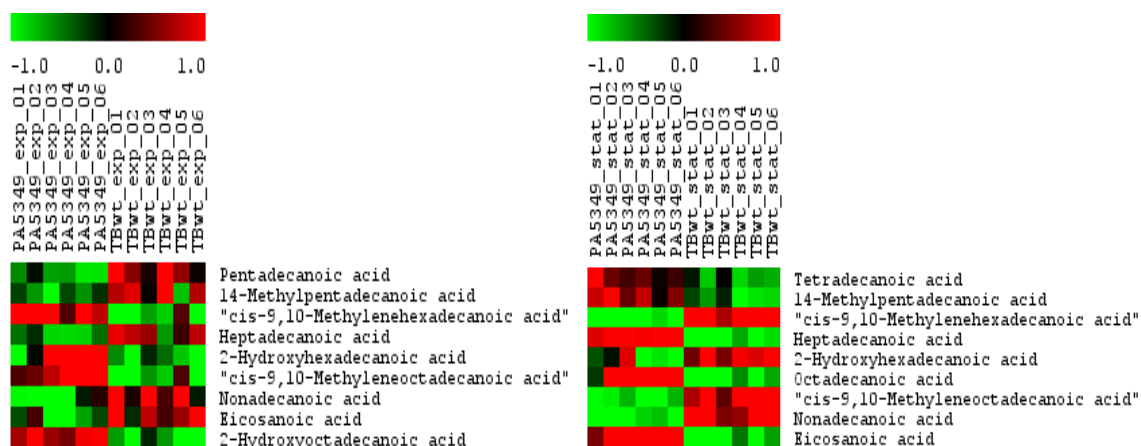


Abb. 75. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests der TM PA5349 sowie des TBCF10839 in der exponentiellen (links) und stationären (rechts) Wachstumsphase auf Succinat. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,05$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Diese Ergebnisse deuten einen Defekt in dem Abbau der gesättigten, langkettigen Alkane in der TM PA5349 an, das mit den Metabolom- sowie Transkriptomdaten unter Verwendung von Succinat als Kohlenstoffquelle (Kap. 3.2.3.6) verifiziert werden kann.

Ungesättigte Fettsäuren (Alkene) hingegen können von der TM PA5349 umgesetzt werden, da diese anderenfalls akkumulieren würden.

In der TM PA5349 wurde mittels einer Transposonintegration die Rubredoxin-Reduktase ([EC 1.18.1.1]) inaktiviert. Die Rubredoxin-Reduktase reguliert die Degradation von Alkanen zu Fettsäuren via Alkoholen sowie Aldehyden und ist im Fettsäure-Metabolismus lokalisiert. Eine Inaktivierung der Rubredoxin-Reduktase hat zur Folge, dass gesättigte, langkettige Fettsäuren bzw. Alkane nicht mehr umgesetzt werden können und akkumulieren. Dies bestätigt die vorliegende Hypothese der Inaktivierung der Rubredoxin-Reduktase in der TM PA5349.

Die in erhöhten Konzentrationen detektierten Cyclopropane cis-9,10-Methylenehexadecanoat und -octadecanoat (c, d in Abb. 73)) in der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839, in der exponentiellen Wachstumsphase der Succinat-Kultivierung liegen möglicherweise in der Stresskompensation begründet und wird aufgrund einer frühen Expression der Cyclopropan-Synthase hervorgerufen.

Im Gegensatz dazu weist TBCF10839, verglichen mit TM PA5349, eine verzögerte Akkumulation der Cyclopropane auf, die eine spätere Stressantwort des Organismus infolge effizienter Adaptation an das Medium verdeutlicht.

3.2.5 Etablierung von Wachstumsbedingungen von Cystische Fibrose-Isolaten auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Im folgenden Abschnitt soll zunächst das Wachstumsverhalten von sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolaten von unterschiedlichen klinischen Cystische Fibrose (CF) -Patienten charakterisiert werden, um anschließend die metabolischen Profile der CF-Isolate zu analysieren. Die Basis dafür stellte die Etablierung der optimalen Wachstumsbedingungen für die Kultivierung der CF-Isolate auf einem Voll- und einem Minimalmedium dar. Dafür wurden jeweils verschiedene Konzentrationen der Medienbestandteile getestet und anschließend die Konzentration, die die höchste exponentielle Wachstumsrate erzielte, verwendet.

In Langzeitstudien (> 20 Jahre) wurden von zahlreichen CF-Patienten klinische *P. aeruginosa*-Isolate in den CF-Zentren Hannover und Kopenhagen gesammelt. Dabei wurden die CF-Patienten alle drei Monate (Hannover, Deutschland) bzw. monatlich (Kopenhagen, Dänemark) untersucht. In regelmäßigen Abständen wurden ihnen Sputumproben aus dem Respirationstrakt entnommen und auf An- bzw. Abwesenheit von *P. aeruginosa* überprüft. Im Rahmen dieser Analyse wurde halbjährlich von jeder *P. aeruginosa*-positiven Sputumprobe mindestens eine Kolonie jedes Morphotyps bei -80°C eingefroren (Cramer, 2009; Bragonzi et al., 2009).

Bei denen dieser Arbeit zugrunde liegenden klinischen *P. aeruginosa* CF-Isolaten handelt es sich um frühe (Pat1A, Pat2A), mittlere (Pat1B, Pat2B) und späte (Pat1C, Pat2C) Isolate zweier CF-Patienten (Pat1, Pat2). Das frühe CF-Isolat repräsentiert den ersten *P. aeruginosa*-positiven Befund in dem CF-Patienten, das mittlere den Befund nach 9 (Pat1B) bzw. 5 (Pat2B) Jahren und das späte den Befund nach 16 (Pat1C) bzw. 13 (Pat2C) Jahren. In Tabelle 34 sind einige Charakteristiken der Patienten aufgeführt.

Tab. 34. Charakteristiken der Cystische Fibrose Patienten

Patient	Geburtsdatum	Geschlecht	CFTR Mutationsgenotyp	Alter der ersten <i>P. aeruginosa</i> Besiedelung des Patienten [Jahren]
1	24.07.1972	m	delF508/delF508	14
2	14.11.1968	m	delF508/delF508	17

In einer Studie von Bragonzi et al. (2009) wurden Patientenisolates von *P. aeruginosa* (zeitliches Intervall der Isolation: 16.3 Jahre) geno- und phenotypisiert. Allgemein führten die frühen und mittleren Isolate zu einer höheren Mortalität von Mäusen als die späten,

was den Verlust von Virulenzfaktoren während der chronischen Infektion in CF-Atemwegen nahelegt. Dennoch variierten die CF-Stämme entsprechend ihres Isolationsdatums nicht in ihrer Fähigkeit, chronische Lungeninfektionen zu verursachen. Das verdeutlicht, dass geno- und phänotypische Veränderungen in klonalen *P. aeruginosa*-Isolaten nicht zu einer reduzierten Virulenz der mittleren oder späten Isolate führt, wie dies in der Studie von Smith et al. (2006) anhand genetischer Daten präsentiert wurde.

Zudem wurde in der Studie von Bragonzi et al. (2009) gezeigt, dass Isolate identischen Genotyps sowohl zu einer akuten (z.B. PA14) als auch zu chronisch persistenten Infektion (z.B. *P. aeruginosa*-Stämme von Patient 1) führen können. Das indiziert eine breite intraklonale Pathogenitätsdiversität des Organismus, jedoch keine Differenzen in der absoluten Virulenz.

Weiterhin konnte mit PA14 der Ursprungsklon des frühen Isolat Pat1A identifiziert werden. Darüber hinaus wurde in der Studie von Thoma (2009) gezeigt, dass das Isolat Pat1C eine *lasR*-Mutation aufweist, die sich in einer Methionin-Auxotrophie äußerte. Für das *P. aeruginosa* CF-Isolat von Patient 2 ist bislang noch kein Ursprung annotiert (Bragonzi et al., 2006).

Ferner zeigen die *P. aeruginosa* CF-Isolate von Patient 1 einen milden und von Patient 2 einen schweren Krankheitsverlauf, wobei bei letzterem der Patient mittlerweile verstarb (Cramer, 2009).

3.2.5.1 Wachstumsverhalten auf Caseinaminosäure-Medium

Ausgangspunkt für die Kultivierung der Patientenisolate und der Referenzstämmen auf einem „Vollmedium“ war die Simulation eines dem Sputum bzw. Mucus CF-infizierter Patienten ähnlichen Mediums. In der Studie von Palmer et al. (2005) wurde ein komplexes, in der Herstellung sehr zeit- und kostenintensives *in vitro* CF-Sputum-Medium entwickelt, das die Physiologie von *P. aeruginosa* während des Wachstums in CF-Sputum verdeutlichen sollte. CF-Sputum bzw. Mucus offeriert einen hohen Grad an Aminosäuren (15-20mM) (Ohman & Chakrabarty, 1982; Barth & Pitt, 1996; Thomas et al., 2000). Um ein adäquates Medium modellieren zu können, das in der Herstellung unkompliziert sowie kosteneffektiv ist und dennoch für *P. aeruginosa* CF-Isolate ideale Wachstumsbedingungen darstellen sollte, bot sich ein Caseinaminosäure (CasAA)-Medium an, das 18 Aminosäuren beinhaltet.

Im Folgenden zeigt Abbildung 67 einen Vergleich des Wachstumsverhaltens von zwei *P. aeruginosa* CF-Isolaten (Pat1, Pat2) mit den entsprechenden Früh- (A), mittleren (B)

und Spät- (C) Isolaten sowie von drei Referenzstämmen (PAO1, TBCF10839, PA14) unter Verwendung von CasAA als Medium und wird durch die in Tabelle 35 aufgeführten spezifischen Wachstumsraten sowie der Verdopplungszeiten der Biomasse ergänzt.

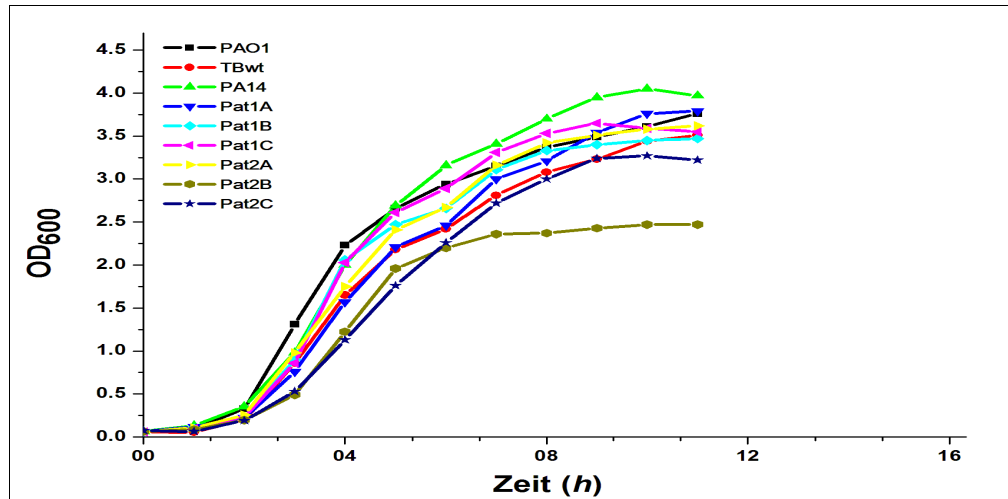


Abb. 76. Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa* CF-Patientenisolaten und Referenzstämmen bei Wachstum auf CasAA-Medium.

Tab. 35. Vergleich der spezifischen Wachstumsrate μ (h^{-1}) und der Verdopplungszeit t (h) der Biomasse, der in Abbildung 58 gezeigten Kultivierungen auf CasAA.

Stämme	Spezifische Wachstumsrate μ (h^{-1})	Verdopplungszeit t (h)
PAO1	0.51	1.37
TBCF10839	0.47	1.47
PA14	0.68	1.02
Pat1A	0.57	1.22
Pat1B	0.54	1.29
Pat1C	0.52	1.33
Pat2A	0.51	1.35
Pat2B	0.76	0.92
Pat2C	0.68	1.02

Abbildung 58 und Tabelle 25 zeigen die Charakteristiken des Wachstumsverhaltens der Patientenisolate im Vergleich zu den Referenzstämmen auf CasAA-Medium. Dabei entspricht die spezifische Wachstumsrate μ der Zunahme der Biomasse pro Zeiteinheit und ist in der exponentiellen Wachstumsphase maximal.

Innerhalb von 2-4 Stunden nach Inokulation der Hauptkultur mit der Übernachtskultur auf eine optische Dichte von 0.05, erreichten sowohl die Referenzstämmen, als auch die Patientenisolate ihre höchste spezifische Wachstumsrate und verdeutlichten somit den optimalen Probenentnahmezeitpunkt im exponentiellen Wachstum bei einer OD_{600} von 1.

Die Kulturen erzielten nach 10 - 11 Stunden eine OD₆₀₀ von 3.25 - 4, mit der Ausnahme von Pat2B, die nach 11 Stunden lediglich eine OD₆₀₀ von 2.4 aufwies. Zudem zeigt Pat2B in Bezug auf die anderen Patientenisolat und Referenzstämme eine höhere Wachstumsrate auf. Dieses Wachstumsverhalten von Pat2B deutet auf eine frühzeitige Induktion der stringenten Kontrolle (*stringent response*), die die Aktivität des QS-Systems steuert, hin. Der Effektor der stringenten Kontrolle ist das Nukleotid Guanosin-3',5'-Bisdiphosphat (ppGpp), das durch das Ribosom-assoziierte RelA Protein synthetisiert wird. Die ppGpp Synthetase Aktivität von RelA wird infolge von Kohlenstoff- oder Aminosäurelimitierung ausgelöst. *P. aeruginosa* ist so in der Lage, auf Nahrungsmangel, beispielsweise in der Besiedlung einer CF-Lunge, unabhängig von ihrer Zelldichte zu agieren, indem die stringente Kontrolle die Produktion von QS-regulierter Virulenzfaktoren frühzeitig aktiviert. Diese Faktoren können die Zellen mittels Enzymaktivität mit neuen Nahrungsquellen versorgen, oder die Zellen können sich mit Hilfe dieser Faktoren in Richtung der favorisierten Nahrungsquellen ausdehnen (van Delden et al., 2001). Im Falle des Isolaten Pat2B würde dies bedeuten, dass das Wachstum frühzeitig stagniert, jedoch das Überleben möglich ist.

3.2.5.2 Wachstumsverhalten auf Glucose-Methionin-Medium

Ausgangspunkt für die Kultivierung der Patientenisolat auf einem Minimalmedium war die Simulation einzelner Nischen in natürlicher Umgebung in Form von reduziertem Medium im Vergleich mit einem nativen Milieu, wie der Lunge (CasAA-Medium). Glucose wurde als Kohlenstoffquelle gewählt, da diese hauptsächlich in Referenzminimalmedien (Palmer et al., 2005) eingesetzt wird. Die Verwendung des Additivs Methionin zur Kohlenstoffquelle beruht auf der Methionin-Auxotrophie von Pat1C. Ferner konnte in Vorversuchen auf Agar-Platten beobachtet werden, dass bei den mittleren sowie späten CF-Isolaten ohne Zugabe von Methionin ein deutlich reduziertes (mittlere CF-Isolate) oder gar kein Wachstum (späte CF-Isolate) zu verzeichnen war. Ein möglicher Grund für dieses Wachstumsverhalten der mittleren und späten Patientenisolat bei Wachstum auf Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle könnte eine effiziente Adaptation an den CF-Lungenmucus des Wirtes darstellen, das einen hohen Grad an Aminosäuren offeriert. Die Beobachtung, dass die späten CF-Isolate kein Wachstum zeigten, korreliert mit einer längeren Persistenz im Respirationstrakt und verifiziert die Annahme der effizienten Adaptation an den Mucus in der Lunge von CF-Patienten.

Infolge der Vorversuche zum Wachstumsverhalten der sechs Patientenisolat auf einem

Minimalmedium kann festgestellt werden, dass die extensive Persistenz in einer CF-Lunge mit dem Verlust der Fähigkeit, ohne bestimmte Aminosäuren wachsen zu können, korreliert.

Die frühen Isolate spiegeln sogenannte Umweltisolate wider, die, bedingt durch ihre Herkunft, an verschiedenartige Nahrungsquellen sowie Milieus, adaptiert sind.

Abbildung 77 zeigt einen Vergleich des Wachstumsverhaltens zweier CF-Isolate (Pat1, Pat2) mit den entsprechenden Früh- (A), mittleren (B) und Spät- (C) Isolaten sowie der drei Referenzstämme (PAO1, TBCF10839, PA14) unter Verwendung von Glucose-Methionin als Medium und wird durch die in Tabelle 36 aufgeführten spezifischen Wachstumsraten sowie der Verdopplungszeiten der Biomasse ergänzt.

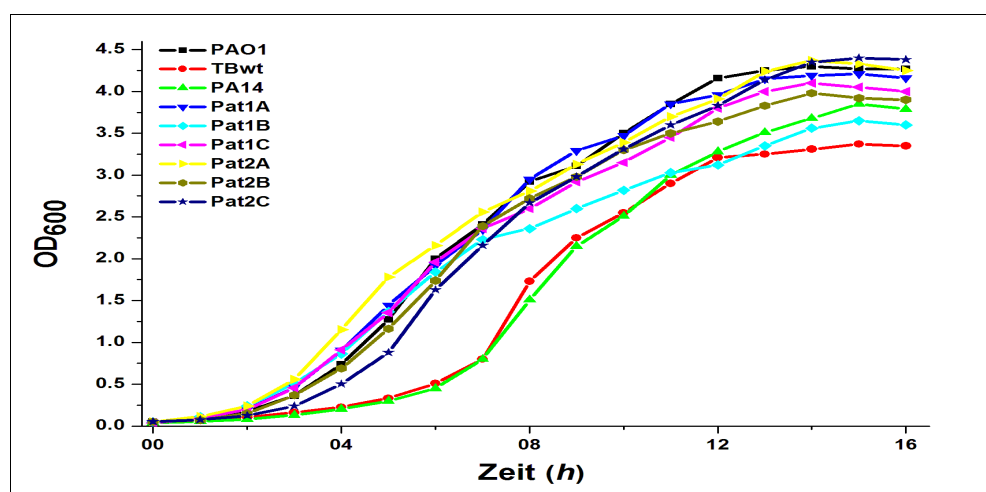


Abb. 77. Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa* CF-Patientenisolaten und Referenzstämmen bei Wachstum auf Glucose-Methionin-Medium.

Tab. 36. Vergleich der spezifischen Wachstumsrate μ (h^{-1}) und der Verdopplungszeit t (h) der Biomasse, der in Abbildung 59 gezeigten Kultivierungen auf Glucose-Methionin.

Stämme	Spezifische Wachstumsrate μ (h^{-1})	Verdopplungszeit t (h)
PAO1	0.96	0.72
TBCF10839	1.54	0.45
PA14	1.17	0.59
Pat1A	0.84	0.83
Pat1B	0.90	0.77
Pat1C	0.83	0.84
Pat2A	0.84	0.83
Pat2B	0.77	0.90
Pat2C	0.92	0.75

In Abbildung 77 und Tabelle 36 lässt sich das Wachstumsverhalten der Patientenisolat im Vergleich zu den Referenzstämmen auf Glucose-Methionin-Medium erkennen. Innerhalb von 4 - 8 Stunden nach Inokulation der Hauptkultur mit der Übernachtskultur auf eine optische Dichte von 0.05 erreichten sowohl die Referenzstämmen, als auch die Patientenisolat ihre höchste spezifische Wachstumsrate und reflektierten somit den optimalen Probenentnahmezeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600} von 1. Die Kulturen erzielten nach 14 - 16 Stunden eine OD_{600} von 3.4 - 4.4 und zeigten zu diesem Zeitpunkt ein stationäres Wachstumshalten.

Bei dem Vergleich der in Abbildung 58 und 59 dargestellten Wachstumskurven wird deutlich, dass sich die Zeitspanne der Adaptation an das Glucose-Methionin-Medium im Gegensatz zum CasAA-Medium erwartungsgemäß verdoppelte, da das CasAA-Medium den nativen Zustand des Respirationstrakts, und somit das favorisierte Milieu, repräsentiert.

Konträr dazu verhalten sich die spezifischen Wachstumsraten beider Kultivierungen, die sich annähernd bei allen Kulturen unter Verwendung des Glucose-Methionin-Medium verdoppelten bzw. verdreifachten (TBCF10839). Das könnte in Relation mit einem diauxischen Wachstum stehen. Möglicherweise wird zunächst Methionin als präferierte Kohlenstoffquelle (Stickstoff-, Schwefelquelle), und nach vollständigem Konsum dessen, Glucose katabolisiert. Mit dem Additiv Methionin wird *P. aeruginosa* eine schnellere und effizientere Aminosäure- und Proteinbiosynthese ermöglicht, was die deutlich erhöhte spezifische Wachstumsrate der Zellen erklären könnte. Speziell bei TBCF10839 und eventuell auch bei PA14 wird ein effizienter Aminosäureimport von Methionin vermutet, was mit der Adaptation an die CF-Lunge sowie dem dadurch hervorgerufenen verstärkten Wachstum korreliert.

Eine Ausnahme stellt erneut Pat2B dar, das in beiden Kultivierungen äquivalente spezifische Wachstumsraten aufweist: einerseits bei Wachstum auf CasAA die höchste, andererseits bei Glucose-Methionin die niedrigste, im Vergleich zu den Referenzstämmen und den anderen Patientenisolaten. Dies deutet an, dass Pat2B ein Medien-unabhängiges Wachstum entwickelt hat, das lediglich in Bezug auf die erreichte End-OD variieren kann. Diese Annahme müsste jedoch durch weitere Wachstumsexperimente auf anderen Kohlenstoffquellen mit und ohne Zusatz von beispielsweise Aminosäuren oder Vitaminen (Biotin) verifiziert werden.

3.2.6 Metabolische Profile von *P. aeruginosa*-Isolaten aus Cystische Fibrose Patienten bei Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Die im Folgenden detaillierter beschriebenen Proben der *P. aeruginosa*-Isolate zweier CF-Patienten der Versuchsansätze mit CasAA als undefinierte und Glucose-Methionin als definierte Kohlenstoffquelle wurden zunächst in der exponentiellen Wachstumskurve geerntet, anschließend aufgearbeitet, mittels der GC-Quadrupol-MS-Technik vermessen und ausgewertet. Die dabei detektierten Targets, aufgeteilt in identifizierte Metabolite und nicht identifizierte Verbindungen, werden in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tab. 37. Tabellarische Übersicht über die verschiedenen Versuchsansätze sowie die detektierten Targets der *P. aeruginosa* CF-Iolate im exponentiellen Wachstum

	Detektierte Targets	Identifizierte Metabolite	Nicht identifizierte Verbindungen
Caseinaminosäuren	183	115	67
Glucose-Methionin	180	119	60

Im Versuchsansatz mit CasAA konnten insgesamt 179 Targets in jedem Patientenisolat detektiert werden, wovon 139 identifizierte und 40 nicht identifizierte Verbindungen darstellten.

Unter Verwendung von Glucose-Methionin konnten insgesamt 175 Targets in jedem Patientenisolat detektiert werden, wovon 128 identifizierte und 47 nicht identifizierte Verbindungen darstellten.

Um den Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Metabolom von *P. aeruginosa* CF-Isolaten zu charakterisieren, wurden zunächst die erhobenen Metabolomdaten (Tab. 28) aus dem exponentiellen Wachstum der Patientenisolate beider Medien in einer PCA (Abb. 60) übersichtlich visualisiert und anschließend beschrieben.

Der Stamm PA14 bildet den Ursprung von Pat1A und dient in den folgenden Vergleichen deshalb als Referenz.

Die Gesamtvarianz der ersten zwei Komponenten der dargestellten PCA beträgt 50% (Abb. 60). Deutlich zu erkennen ist die Distanzierung der metabolischen Profile der Kohlenstoffquellen in zwei separate Cluster. Auffallend ist dabei die Variation in der Streuung der metabolischen Profile innerhalb dieser zwei Cluster.

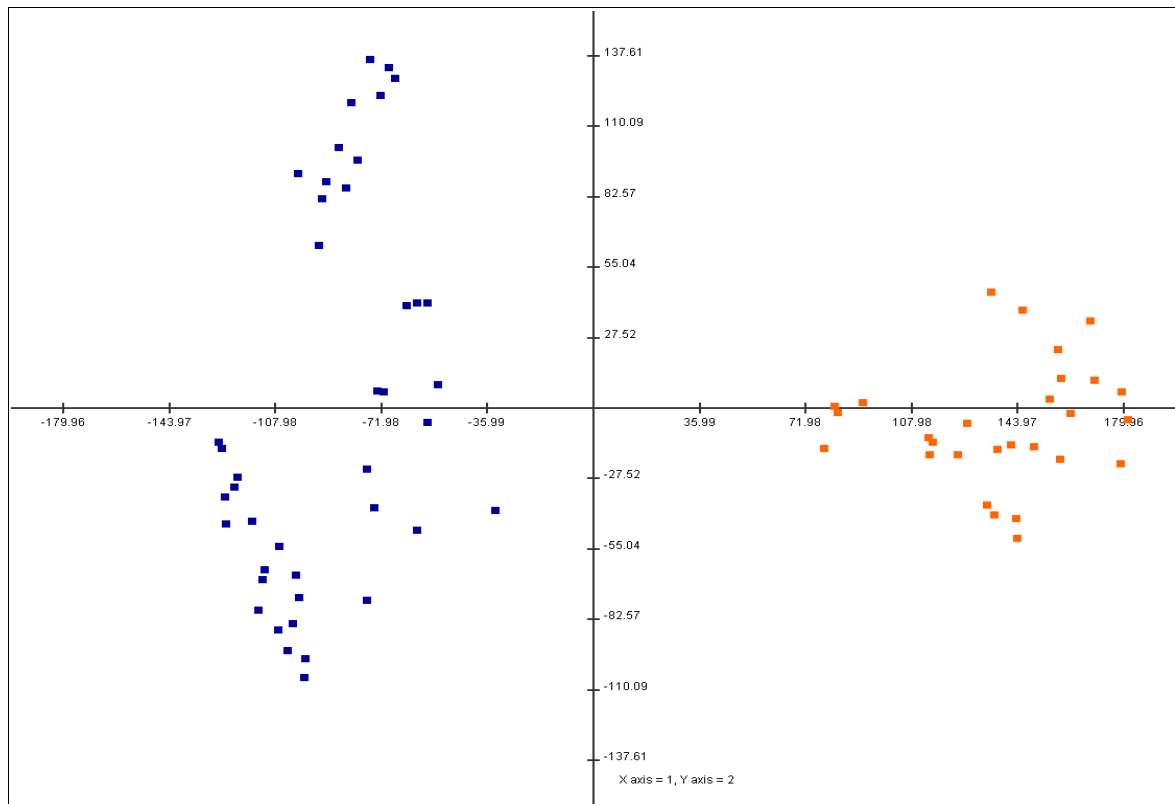


Abb. 78. Vergleich der metabolischen Profile im exponentiellen Wachstum von PA14 sowie der Isolate Pat1 und Pat2 mit jeweils der frühen, mittleren und späten Isolaten. Blaue Punkte stellen das CasAA-Medium, orange Punkte das Glucose-Methionin Medium dar. Die Komponenten 1 und 2 bilden 50% der Varianz.

Dies zeigt, dass die Zusammensetzung der Medien für den Metabolismus des Referenzstammes PA14 sowie der klinischen CF-Isolate relevant ist. Die Zusammensetzung des CasAA-Mediums ähnelt der dem Mucus von CF-Patienten, da beide einen hohen Gehalt an Aminosäuren aufweisen. Diese Vielfalt an offerierten Aminosäuren in dem Mucus einer CF-Lunge könnte in *P. aeruginosa* einen Stamm-spezifischen Aminosäure-Katabolismus entwickelt haben, der bei Wachstum auf CasAA ebenfalls zu beobachten ist. Weist beispielsweise ein Regulator, der einen Defekt im Import von Aminosäuren bewirkt, eine Mutation auf, spiegelt sich dies in dem unterschiedlichen Verhalten in den metabolischen Profilen wider, indem sich die Auswirkungen der Mutation ausgeprägter abzeichnen würden. Diese Annahme kann durch die breit gefächerte Streuung der CasAA-Kulturen bekräftigt werden.

Folglich stehen diese Ergebnisse in Relation mit einer verschiedenartigen Adaptation an den Respirationstrakt des Patienten und mit erworbenen Überlebensstrategien.

Konträr dazu weist das Glucose-Methionin-Medium nur die Aminosäure Methionin mit einer 1mM Konzentration auf. Die geringe Streuung der Proben des Glucose-Methionin-

Mediums (orange) deutet einen äquivalenten Methionin-Katabolismus in PA14 und den CF-Isolaten an, der essentiell für das Überleben von *P. aeruginosa* sein könnte und seltener von Mutationen beeinflusst wird als andere Stoffwechselwege.

Aufgrund der klaren Unterteilung beider Medien in zwei Cluster (Abb. 60), erfolgt einleitend die Analyse der metabolischen Profile der *P. aeruginosa*-Isolate von Patient 1, verglichen mit PA14, unter Verwendung des undefinierten Mediums CasAA.

3.2.6.1 Metabolische Profile von *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient 1 im Vergleich zu PA14 bei Wachstum auf CasAA

Für eine detailliertere Charakterisierung der Patientenisolate des Patienten 1 und dem Referenzstamm PA14 bei Wachstum auf CasAA werden die Metabolomdaten anhand einer PCA (Abb. 79) visualisiert. Die erste und zweite Komponente der PCA reflektieren zusammen eine Gesamtvarianz von 61%. Deutlich zu erkennen ist die Separierung der einzelnen Isolate von PA14 (petrol) und eine geringere Distanz zwischen den Patientenisolaten.

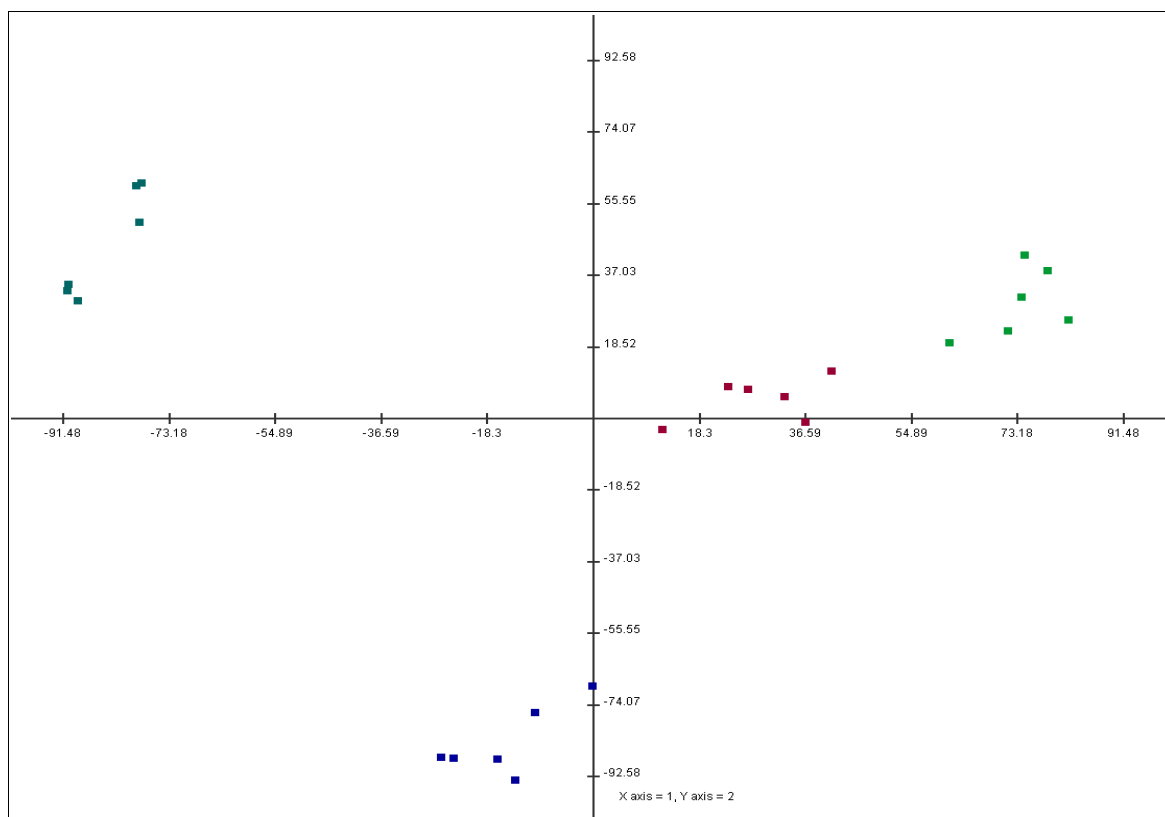


Abb. 79. PCA der metabolischen Profile von PA14 (petrol), der Patientenisolate Pat1A (blau), 1B (grün) und 1C (dunkelrot) bei exponentiellem Wachstum auf CasAA. Die Gesamtvarianz der 1. und 2. Komponente beträgt zusammen 61%.

Werden die für die PCA verwendeten Proben in einer HCA (Abb. 80) abgebildet, reflektieren diese ein äquivalentes Muster zu den Ergebnissen der PCA. In der HCA bilden sich zwei Hauptcluster, die sich aus jeweils zwei Unterclustern zusammensetzen. Die vier einzelnen Untercluster bestehen jeweils aus 6 Replikaten der einzelnen Stämme. Aufgrund des Ursprungs des Isolats Pat1A clustert dies erwartungsgemäß mit PA14 (Hauptcluster 1) und die Isolate Pat1B und Pat1C (Hauptcluster 2) zusammen. Pat1A stellt ein Isolat dar, das direkt nach dem ersten positiven *Pseudomonas*-Befund in der CF-Lunge von Pat1 isoliert wurde, und konnte sich daher an das ihn umgebende Milieu geringfügiger als das mittlere und späte Isolat adaptieren.

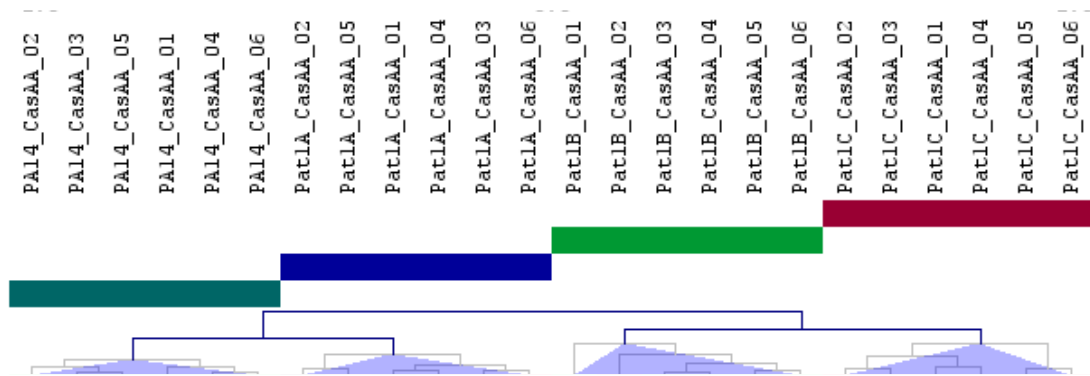


Abb. 80. HCA der metabolischen Profile von PA14 (petrol), der Patientenisolate Pat1A (blau), 1B (grün) und 1C (dunkelrot) bei exponentiellem Wachstum auf CasAA.

Pat1B und Pat1C stellen das mittlere und späte Isolat aus dem Patienten 1 dar und verdeutlichen anhand der gezeigten Daten eine Distanzierung zu PA14 und Pat1A, die in Relation mit einer längeren Persistenz in der Lunge des CF-Patienten, und folglich einer effizienteren Adaptation an dieses Milieu, steht.

Die kalkulierten Korrelationen nach Pearson (Tab. 29) zeigen Unterschiede in den metabolischen Profilen von PA14 und der Patientenisolate auf. Zudem kann eine Annäherung des Isolats Pat1C an PA14 anhand einer höheren Korrelation (0.93) beobachtet werden.

Tab. 38. Pearson Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen im exponentiellen Wachstum auf CasAA von PA14 sowie der Patientenisolate Pat1A-1C unter Angabe des relativen Gesamtfehlers der Metabolitkonzentrationen.

	PA14	Pat1A	Pat1B	Pat1C	Relativer Gesamtfehler
PA14	1	0.9	0.89	0.93	8.0%
Pat1A	0.9	1	0.85	0.92	7.7%
Pat1B	0.89	0.85	1	0.92	7.8%
Pat1C	0.93	0.92	0.92	1	10.8%

Der Vergleich der relativen, semiquantitativen Metabolitkonzentrationen vom Isolat Pat1A und vom Referenzstamm PA14 wird in einem Streudiagramm (Abb. 81) beschrieben und bei Bedarf detektierte Varianzen im metabolischen Profil der Isolate Pat1B und Pat1C zu PA14 aufgeführt. Die hoch- und herunterregulierten Metabolite sind in den Tabellen 72-74, S. 249 - 251 im Anhang aufgeführt. Die diskutierten Stoffwechselwege sind in den Zusatzblättern für *P. aeruginosa* PAO1 im Anhang präsentiert.

Die für die Streudiagramme verwendeten Proben bestehen jeweils aus sechs Replikaten, deren gemessene Metabolitkonzentrationen gemittelt wurden. Die Zellen der Proben der exponentiellen Wachstumsphase der Kultivierung wiesen zu diesem Entnahmezeitpunkt die höchste spezifische Wachstumsrate und dadurch die niedrigste Verdopplungszeit der Biomasse auf (vgl. Kap. 3.2.3.1, Abb. 58, Tab. 35).

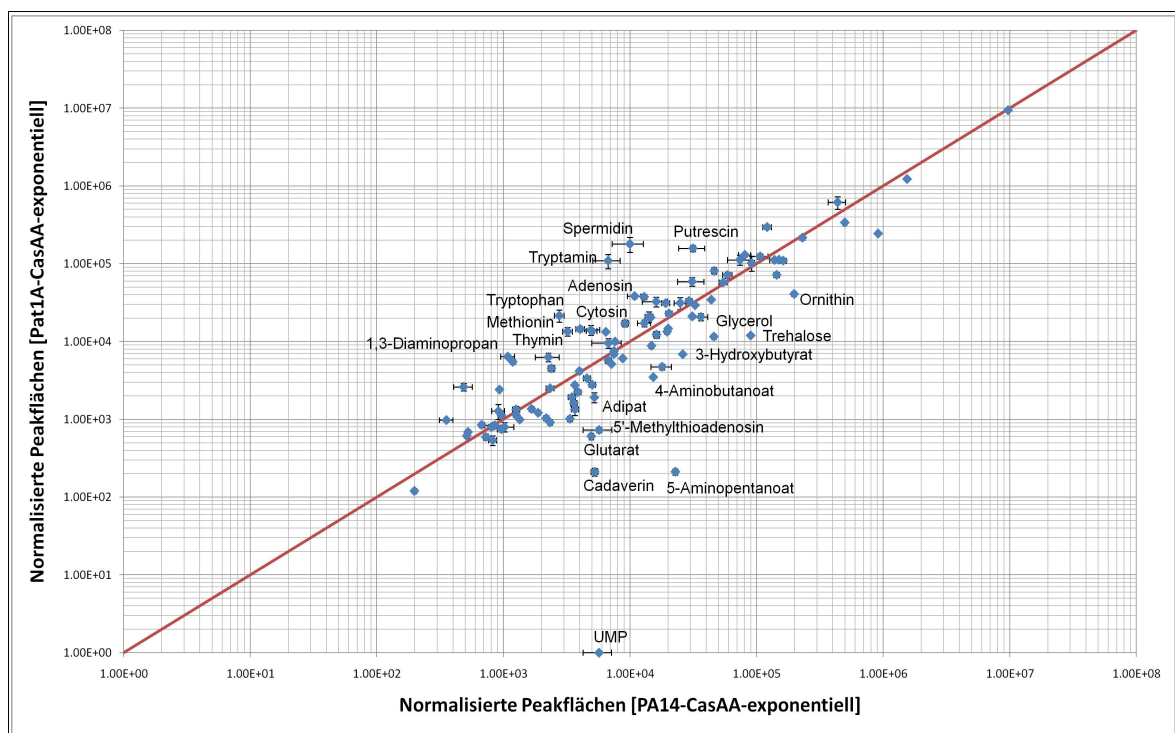


Abb. 81. Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von Pat1A, verglichen mit PA14 auf CasAA in der exponentiellen Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Signifikante Akkumulation der Intermediate des Nukleotid-Metabolismus (Adenosin, Thymin, Cytosin), des Arginin- und Prolin-Metabolismus bzw. der Polyamin-Biosynthese und β -Alanin-Metabolismus (Putrescin, Spermidin, 1,3-Diaminopropan) sowie des Tryptophan-Metabolismus (Tryptophan, Tryptamin) wurden in dem Isolat Pat1A, verglichen mit PA14, bei Wachstum auf CasAA-Medium detektiert (Abb. 81, 82).

Konträr dazu weisen Metabolite der Lysin-Degradation (Cadaverin, 5-Aminopentanoat,

Glutarat), des Arginin- und Prolin-Metabolismus bzw. der Polyamin-Biosynthese (Ornithin, 4-Aminobutanoat) sowie 5'-Methylthioadenosin, Trehalose, 3-Hydroxybutanoat und Glycerol reduzierte Konzentrationen in dem Isolat Pat1A, verglichen mit PA14, auf.

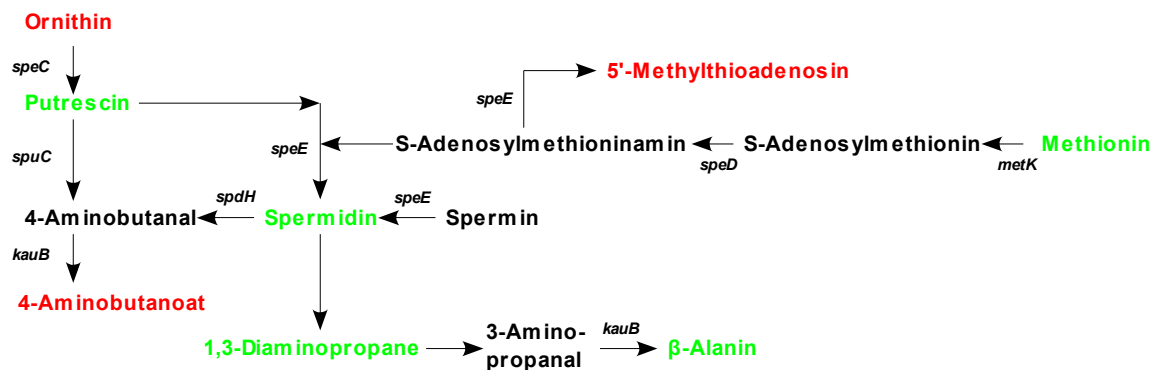


Abb. 82. Intermediate aus dem Arginin- und Prolin-Metabolismus, der Polyamin-Biosynthese, dem β -Alanin-Metabolismus, Cystein- und Methionin- sowie AHL-Metabolismus. Grüne Intermediate symbolisieren eine Zunahme, rote eine Abnahme der Metabolitkonzentrationen in den Patientenisolaten Pat1A-1C, verglichen mit PA14, bei exponentiellem Wachstum auf CasAA.

Polyamine sind in der Antibiotika-Resistenz, beim Schutz vor äußerem oxidativem Stress (Jung et al., 2003; Tkachenko et al., 2001), wie Radiation (Kim & Oh, 2000), saurem pH (Samartzidou et al., 2003; Soksawatmaekhin et al., 2004) und anderen toxischen Agentien (Chattopadhywa et al., 2003; Minton et al., 1990) involviert. Zusätzlich sind Polyamine auch als Modulator in der DNA Replikation, Transkription, Translation sowie der Proteinaktivität in *E. coli* bekannt (Dela Vega & Delcour, 1996).

In einer Studie von Bitonti et al. (1982) konnte in *P. aeruginosa* gezeigt werden, dass die Verminderung intrazellulärer Polyamin-Konzentrationen mit einer gesteigerten Generationszeit korreliert. In den Isolaten Pat1A-1C zeigen die Polyamine (Spermidin, Putrescin) und Folgeprodukte (1,3-Diaminopropan, β -Alanin) eine erhöhte intrazelluläre Konzentration auf (Abb. 64), was eine Verringerung der Generationszeit andeutet. Werden die spezifischen Wachstumsraten (Tab. 25) hinzugezogen, kann diese Vermutung gestützt werden. Die Patientenisolate Pat1A-1C weisen eine spezifische Wachstumsrate von 0.57 h^{-1} (Pat1A), 0.54 h^{-1} (Pat1B) und 0.52 h^{-1} (Pat1C) und der Referenzstamm PA14 eine von 0.68 h^{-1} auf.

Die Verminderung der Intermediate der Lysin-Degradation, von 5'-Methylthioadenosin sowie die erhöhte Konzentration des Aromaten Tryptophan und des Folgeproduktes Tryptamin in Pat1A könnten in direkter Relation mit der PQS-Biosynthese (vgl. Kap. 3.2.2.1) und dadurch bedingter verminderter Virulenz von Pat1A stehen.

Für Tryptamin existiert laut KEGG in *P. aeruginosa* PAO1 und PA14 kein Enzym, das für die Reaktion von Tryptophan zu Tryptamin kodiert. In *P. putida* KT2440 hingegen ist laut KEGG die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase [EC 4.1.1.28] annotiert, die unter Abspaltung von CO₂ Tryptamin synthetisiert. Daher kann angenommen werden, dass dieses Enzym ebenfalls in PAO1 und PA14 präsent ist.

Die veränderten Konzentrationen der Speicherstoffe Trehalose, 3-Hydroxybutanoat sowie Glycerol könnten eine erhöhte Effizienz in der Stresskompensation infolge der Sauerstofflimitation während des exponentiellen Wachstums von PA14 reflektieren.

Der Vergleich semiquantitativer Daten des Isolats Pat1B (Abb. 82, 83) und Pat1C (Abb. 82, 84) mit PA14 lassen einen zu Pat1A ähnlichen Charakter erkennen (Tab. 73-74; S. 249-251). Ebenfalls wird eine signifikante Akkumulation der Nukleinbasen, der Polyamine, deren Vorläufer sowie Folgeprodukte deutlich, die mit den vermindert vorliegenden spezifischen Wachstumsraten von Pat1B sowie Pat1C (Tab. 35) im Einklang stehen.

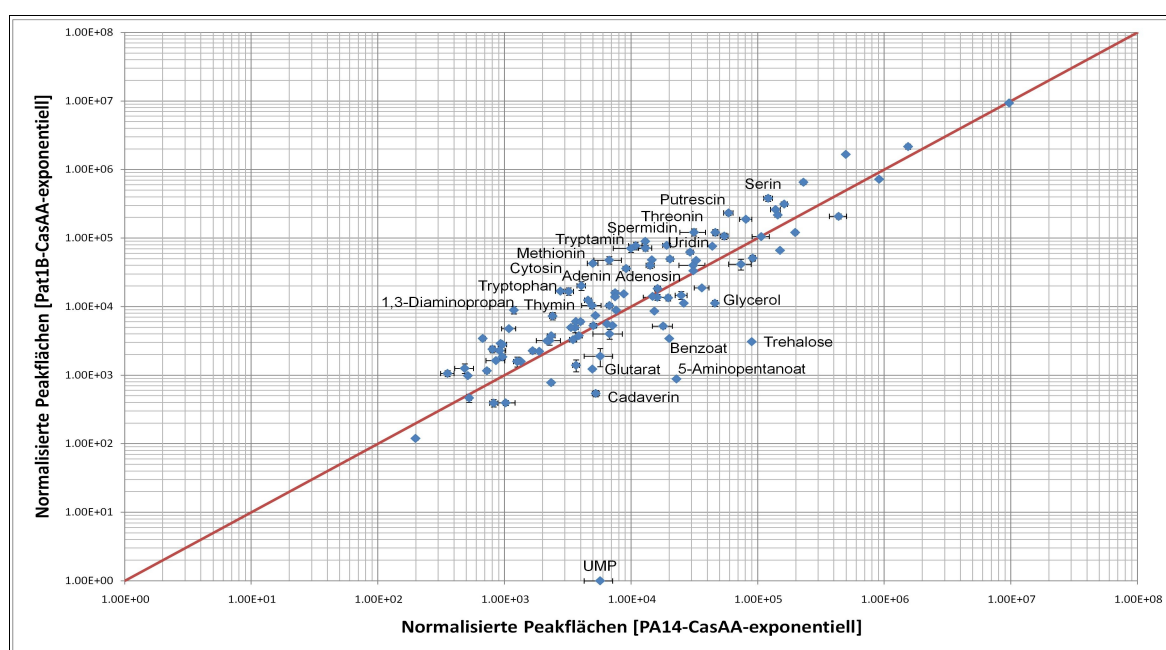


Abb. 83. Logarithmische Auftragung mittlerer Metabolitkonzentrationen von Pat1B, verglichen mit PA14, auf CasAA in der exponentiellen Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

Einerseits ist die Zunahme in Pat1B und andererseits die Abnahme in Pat1C der Konzentrationen der Aminosäuren Methionin, Threonin, Serin, Leucin sowie Lysin, verglichen mit PA14 bei exponentiellem Wachstum auf CasAA, auffallend. Das könnte einen produktiven Aminosäureimport des Pat1B Isolats im Gegensatz zu PA14 reflektieren.

Ferner zeigen geringere Konzentrationsunterschiede im metabolischen Profil (Abb. 84, Tab. 74, S. 250-251) sowie die höhere Korrelation vom Isolat Pat1C (0.93) zu PA14 im Gegen-satz zu Pat1A (0.9) und Pat1B (0.89) (Tab. 38) eine Entwicklung in Richtung Ursprung (Abb. 61), die aufgrund der erworbenen *lasR*-Mutation hervorgerufen worden sein könnte.

In den *P. aeruginosa*-Isolaten von CF-Patienten korreliert die Mutationsrate mit der Persistenz im Mucus der CF-Patienten (Smith et al., 2006). Dabei entwickeln sich verstärkt Mutationen im *Multidrug Efflux* Gen *mexZ* sowie im QS-Regulator *lasR*. Beispielsweise führt eine *lasR*-Mutation zu einem Funktionsverlust der Produktion von Virulenzfaktoren, Biofilmbildung und erhöhter Antibiotikaresistenz (Singh et al., 2000). Allerdings sind Virulenzfaktoren wie Pyocyanin und Elastase für akute Infektionen Voraussetzung. Ein Grund für diesen Funktionsverlust ist, dass das Immunsystem eines Patienten diese Faktoren erkennt und die Virulenzfaktor-sezernierenden Zellen, vernichtet (Hollsing et al., 1987). Werden keine Virulenzfaktoren exportiert, stellt das einen Überlebensvorteil für *P. aeruginosa* dar und ermöglicht eine längere Persistenz im Mucus von CF-Patienten. Die *lasR*-Mutation in dem Spätsolat Pat1C repräsentiert demnach eine Überlebensstrategie und symbolisiert den Adaptations- sowie Evolutionsprozess in dem Patienten.

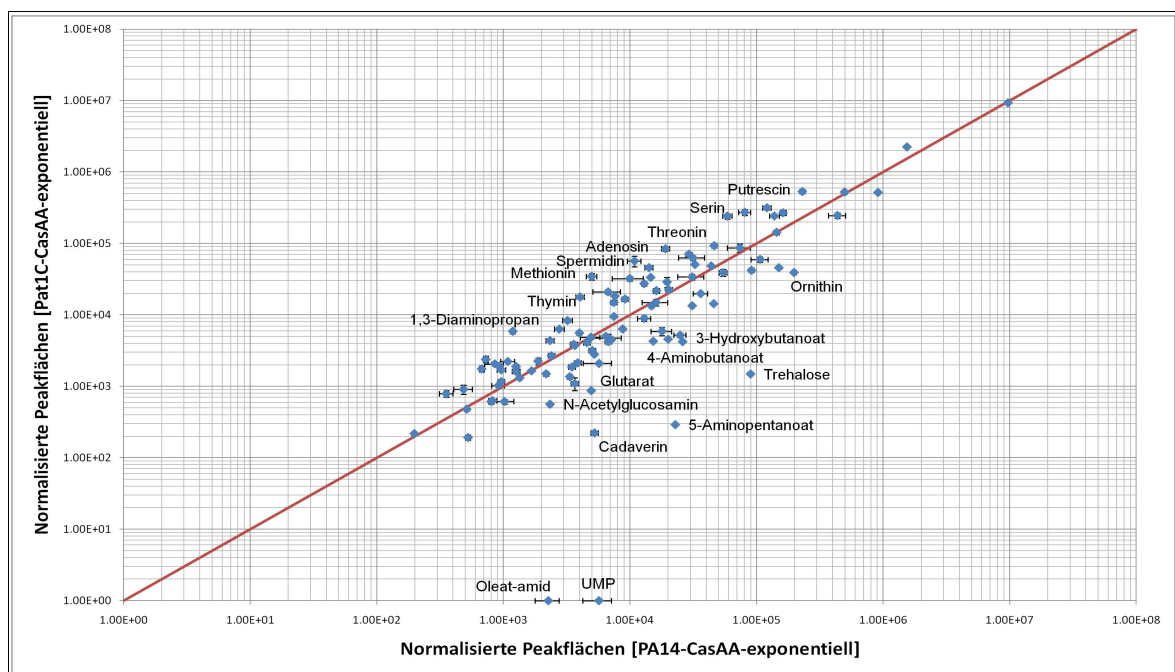


Abb. 84. Logarithmische Auftragung mittlerer Metabolitkonzentrationen von Pat1C, verglichen mit PA14 auf CasAA in der exponentiellen Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.

3.2.6.2 Metabolische Profile von *P. aeruginosa*-Isolaten aus Patient 1 bei Wachstum auf CasAA im Vergleich

Um die metabolischen Profile der Patientenisolats Pat1A-1C untereinander charakterisieren zu können, werden die Analysen mittels T-Test durchgeführt.

Der angewendete T-Test liefert eine Entscheidungshilfe, ob ein ermittelter Mittelwertsunterschied zufällig entstanden ist oder reelle bedeutsame Unterschiede zwischen den zu analysierenden Gruppen bestehen. Vereinfacht: ob untersuchte Gruppen in ihrem arithmetischen Mittel systematisch variieren oder nicht (vgl. Kap. 2.8.6).

Dabei symbolisiert die rote Farbcodierung erhöhte und die grüne reduzierte relative Konzentrationen in dem entsprechenden Medium und den untersuchten Organismen.

Die relevanten t- und p-Werte der Vergleiche sind im Anhang aufgeführt (Tab. 75-77; S. 252-254).

Einleitend wird das Metabolom des frühen und des mittleren Isolats von Patient 1 analysiert.

Vergleich Isolat Pat1B mit Pat1A bei Wachstum auf CasAA

In Abbildung 85 werden die metabolischen Profile der Isolate Pat1B und Pat1A bei exponentiellem Wachstum auf CasAA mit Hilfe des T-Tests dargestellt und anschließend beschrieben (Tab. 85; S. 224-226). Der relative Gesamtfehler von Isolat Pat1B 7.8% und der von Isolat Pat1A beträgt 7.7%.

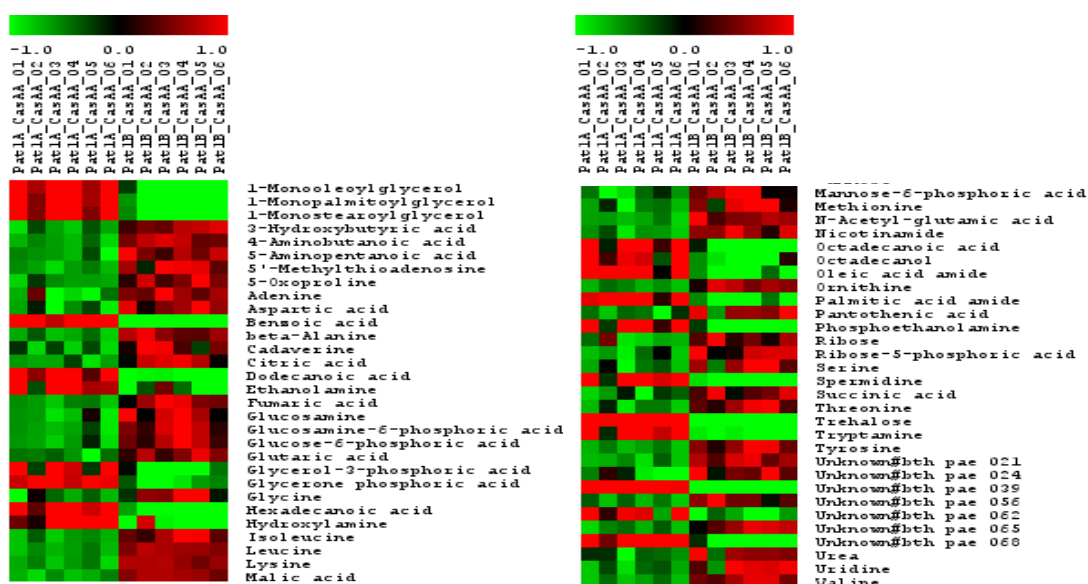


Abb. 85. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1B, verglichen mit Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Deutlich wird ein antiparalleles Verhalten der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (1-Monooleylglycerol, 1-Monopalmitoylglycerol, 1-Monostearoylglycerol, Dodecanoat, Ethanolamin, Hexadecanoat, Octadecanoat, Octadecanol, Palmitat amid), des Zitronensäurezyklus (Citrat, Fumarat, Malat, Succinat), der Aminosäuren (Asparat, β -Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, N-Acetyl-glutamat, Ornithin, Pantothenat, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin) sowie der Zuckerphosphate (Glucosamin-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat, Ribose-5-phosphat) in den Isolaten Pat1A und Pat1B. Dieses Verhalten der metabolischen Profile der Isolate Pat1A und Pat1B kann mit einer geringen Korrelation von 0.85 verifiziert werden.

Erneut kann das konträre Verhalten der Intermediate Ornithin, Spermidin, 4-Aminobutanoat, 5'-Methylthioadenosin (Abb. 67) beobachtet werden (vgl. Kap. 3.2.4.1).

Die Akkumulation des Zitronensäurezyklus und folglich der Aminosäuren in Pat1B deutet auf eine signifikante Dezimierung des Acetyl-CoA-Pools hin, so dass kein Acetyl-CoA in die Fettsäureproduktion eingeleitet werden kann. Zudem könnte das metabolische Profil des Isolats Pat1B, verglichen mit Pat1A, auf einen effizienten Aminosäureimport und -biosynthese hinweisen, was mit den erhöhten Konzentrationen der Zuckerphosphate korreliert.

Außerdem weist Pat1B die Intermediate der Lysin-Degradation, 5'-Methylthioadenosin sowie Methionin in erhöhten Konzentrationen auf, was mit einem erhöhten Acyl-Homoserinlacton (AHL)-Metabolismus erklärt werden könnte. Diese Vermutung deckt sich mit der Studie von Bragonzi et al. (2009), in der die Fähigkeit der *P. aeruginosa*-Isolate beschrieben wurde, selbst nach Jahren der Persistenz im Wirt, chronische Lungeninfektionen zu verursachen.

In der Dissertation von Cramer (2009) wurde anhand von Phänotypisierungsanalysen aufgezeigt, dass ein Anstieg der Sekretion von Siderophoren, Protease, Pyocyanin sowie Elastase von Pat1A zu Pat1B zu verzeichnen war. Die sekretierten Komponenten beschreiben Virulenzfaktoren in *P. aeruginosa* und deuten eine erhöhte Virulenz des Pat1B, verglichen mit Pat1A, an, die mit einem erhöhten AHL-Metabolismus in Pat1B korreliert.

Andererseits könnten die akkumulierten Fettsäuren in dem Isolat Pat1A, verglichen mit Pat1B, mit der Zusammensetzung der Zellwand und den darin enthaltenen Lipopolysacchariden zusammenhängen. Lipopolysaccharide, Pathogenitätsfaktor Gram-negativer Bakterien, bilden die wichtigsten Oberflächenkomponenten dieser Bakterien und bestehen aus drei verschiedenen strukturellen Elementen: O-Antigen, Kern und Lipid A (Ernst et al., 1999; Berger, 2002; Hajjar et al., 2002). Das O-Antigen und der Kern setzen

sich aus Polysaccharidketten zusammen, wohingegen Lipid A aus Fettsäuren und Phosphat-gruppen besteht, die an ein Glucosamin-Disaccharid gebunden sind (Trent, 2004; Whitfield et al., 2003). Lipid A wird von dem angeborenen Immunsystem des Patienten erkannt. Für *P. aeruginosa* Infektionen von CF-Lungen ist es daher bedeutend, verschiedene spezifische Lipid A-Strukturen zu synthetisieren (Ernst et al., 2006), um das angeborene Immunsystem des Patienten zu umgehen. In vorherigen Studien von Ernst et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass die frühe Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge direkt nach Kolonisation durch modifiziertes Lipid A hervorgerufen wurde. Die Modifikationen von Lipid A werden durch die Zwei-Komponenten-Systeme PhoP/PhoQ sowie PmrA/PmrB reguliert, wobei das PhoP/PhoQ- Regulationssystem für die Addition von Palmitat (Hexadecanoat, C16 Fettsäure) und Aminoarabinose notwendig ist (Ernst et al., 1999; Macfarlane et al., 1999; Macfarlane et al., 2000; Moskowitz et al., 2004) und PmrA/PmrB zusätzlich die Addition von Aminoarabinose übernimmt.

Folglich könnten die signifikant akkumulierten Metabolite (z. B. Dodecanoat, Hexadecanoat, Octadecanoat, Octadecanol, Oleat amid, Palmitat amid) des Fettsäure-Metabolismus die Vorstufen für Lipopolysaccharide und speziell für Lipid A darstellen, die der Modifikation von Lipid A durch Hexadecanoat und ferner einer effizienteren Adaptation dienen könnten, da Pat1A das Isolat nach direkter Kolonisation mit *P. aeruginosa* repräsentiert.

Vergleich Isolat Pat1C mit Pat1A bei Wachstum auf CasAA

Abbildung 86 stellt einen Vergleich zwischen dem späten Isolat Pat1C und dem frühen Isolat Pat1A von Patient 1 mit Hilfe des T-Tests an (Tab. 76; S. 252-253). Der relative Gesamtfehler von Pat1A beträgt 7.7% und von Pat1C 10.8%.

Die Gegenüberstellung metabolischer Profile der Isolate Pat1C und Pat1A (Abb. 68) reflektiert geringere Varianzen als der Vergleich der Isolate Pat1B zu Pat1A, das mit der kalkulierten Korrelation von 0.92 verifiziert werden kann.

Ein paralleles Verhalten verringerter Metabolitkonzentrationen der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (Ethanolamin, Oleat amid), von Nicotinamid, der Zucker und deren Phosphate (3-Phosphoglycerat, Fructose, Fructose-6-phosphat, Trehalose), der Zitronensäurezyklus-Intermediate (Fumarat, Succinat) und Vorläufer (Pyruvat), mit Ausnahme von Citrat, kann im Isolat Pat1C detektiert werden. Dahingegen zeigen im wesentlichen Aminosäuren (Asparat, Isoleucin, Leucin, Serin, Threonin, Valin) sowie Uridin-5'-monophosphat signifikant erhöhte Konzentrationslevel im Isolat Pat1C, verglichen mit Pat1A, auf.

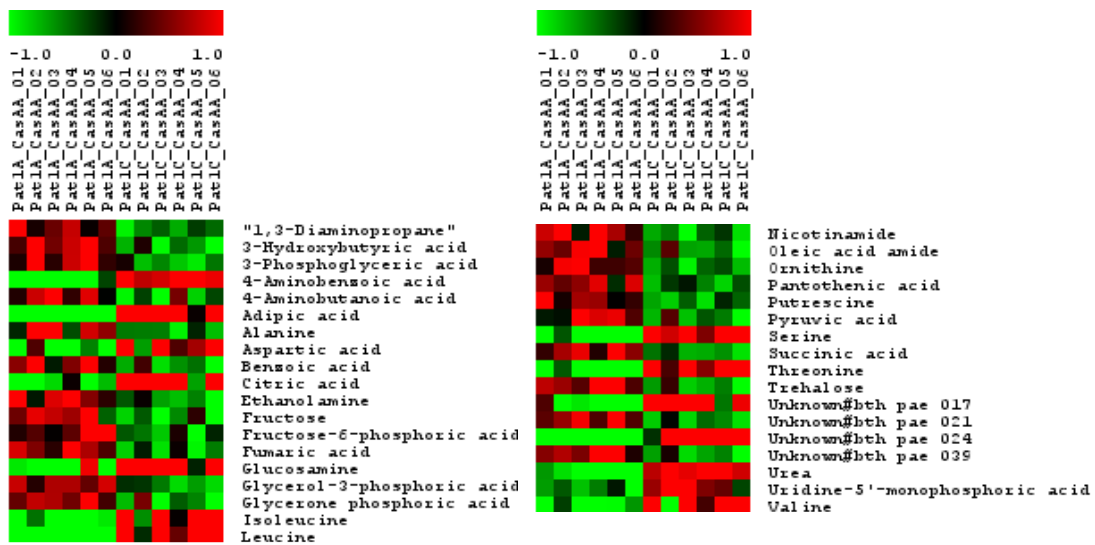


Abb. 86. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C, verglichen mit Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Das metabolische Profil vom Isolat Pat1C, verglichen mit dem Isolat Pat1A, verdeutlicht einen ineffizienteren Energie-Metabolismus, der in Relation mit der leicht verminderten spezifischen Wachstumsrate (Tab. 35) steht.

Allerdings weist das metabolische Profil des Isolats Pat1C, verglichen mit Pat1A, auf einen produktiven Aminosäureimport sowie -biosynthese hin, die sich durch die erworbene *lasR*-Mutation ausgeprägt haben könnten, das wiederum mit einer Langzeit-Adaptation an das umgebende Milieu folglich mit einer längeren Persistenz im Mucus einer CF-Lunge, korreliert.

Vergleich Isolat Pat1C mit Pat1B bei Wachstum auf CasAA

In Abbildung 87 wird ein Vergleich zwischen dem späten Isolat Pat1C und dem mittleren Isolat Pat1B von Patient 1 mit Hilfe des T-Tests (Tab. 77; S. 253-254) visualisiert und beschrieben.

Der relative Gesamtfehler von Pat1C 10.8% und der von Pat1B beträgt 7.8%.

Die vermindert detektierten Varianzen (Abb. 69) bei dem Vergleich der Isolate Pat1C und Pat1B verdeutlichen, dass sich der Metabolismus der einzelnen Isolate in einem Intervall von 7 Jahren nicht signifikant verändert hat, das wiederum auf eine stabile Adaptation an das Milieu im Respirationstrakt hinweist. So könnte die These aufgestellt werden, dass das Isolat Pat1B den Übergangszustand in der Adaptation repräsentiert.

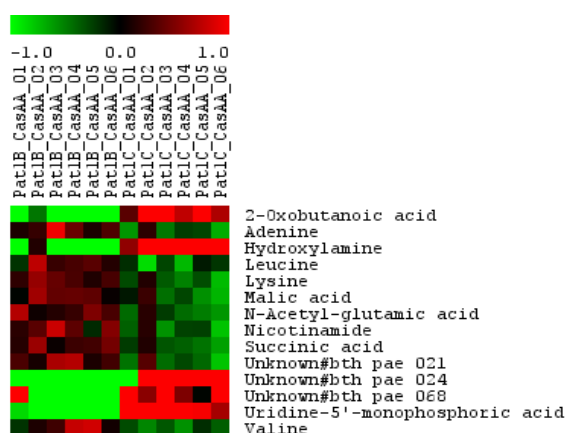


Abb. 87. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C, verglichen mit Pat1B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Unterschiede lassen sich im wesentlichen in Pat1C an den reduzierten Pool-Größen von Aminosäuren, Zitronensäurezyklus-Intermediaten, Adenin, Uridin-5'-monophosphat sowie Nicotinamid festlegen und deuten auf einen geringfügig verminderten Energie-Metabolismus in Pat1B, verglichen mit Pat1C, hin.

Die Ergebnisse der metabolischen Profile der drei auf CasAA-Medium analysierten Isolate Pat1A-1C sind ein Indiz dafür, dass das Frühisolat die erste Adaptation an die Lunge nach der Kolonisation mit *P. aeruginosa* infolge der Akkumulation der Fettsäuren darstellt. Das mittlere Isolat reflektiert ein Übergangsstadium und das Spätisolat aufgrund der *lasR*-Mutation einen Vorteil in der Langzeit-Adaptation an den Mucus eines CF-Patienten.

Nach der Charakterisierung der *P. aeruginosa*-Isolate von Patient 1 werden die Ergebnisse der Analyse des Metaboloms der *P. aeruginosa*-Isolate von Patient 2 vorgestellt und einleitend mit Korrelationskoeffizienten beschrieben.

3.2.6.3 Metabolische Profile von *P. aeruginosa*-Isolaten aus Patient 2 bei Wachstum auf CasAA im Vergleich

Für die *P. aeruginosa*-Isolate von Patient 2 ist bislang kein Referenzstamm bekannt, daher erfolgt zunächst der Vergleich innerhalb der Isolate von Patient 2, bevor ein Vergleich zwischen den Isolaten von Patient 1 und Patient 2 angestellt wird.

Die kalkulierten Korrelationen nach Pearson (Tab. 30) verdeutlichen signifikante Varianzen zwischen den einzelnen *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient 2. Der größte Unterschied besteht bei dem Vergleich der Isolate Pat2B und Pat2C. Dabei weist die Korrelation lediglich einen Wert von 0.55 auf. Die höchste Korrelation von 0.8 wird bei dem Vergleich Pat2A mit Pat2C erreicht.

Tab. 39. Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums auf CasAA der Patienten isolate Pat2A-2C unter Angabe des relativen Gesamtfehlers der Metabolitkonzentrationen

	Pat2A	Pat2B	Pat2C	Relativer Gesamtfehler
Pat2A	1	0.68	0.8	11.6%
Pat2B	0.68	1	0.55	9.2%
Pat2C	0.8	0.55	1	8.1%

Um die metabolischen Profile der Patienten isolate Pat2A-2C im exponentiellen Wachstum nach Kultivierung auf dem CasAA-Medium untereinander charakterisieren zu können, werden die Analysen mittels T-Test durchgeführt. Die entsprechenden t- und p-Werte der Vergleiche sind im Anhang aufgeführt (Tab. 66; S. 228-232).

Zunächst wird der Vergleich des Isolats Pat2A mit Pat2B analysiert und beschrieben. Dabei beträgt der relative Gesamtfehler von Pat2A 11.6% und von Pat2B 9.2%.

Vergleich Isolat Pat2B und Pat2A bei Wachstum auf CasAA

Die geringe Korrelation (Tab. 29) von 0.68 der Isolate Pat2B und Pat2A sowie ferner die beträchtliche Anzahl an veränderten Metaboliten (Abb. 70) bei Wachstum auf CasAA reflektieren einen Wandel im Metabolismus des Pat2B Isolats (Tab. 78; S. 254-255).

Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (z.B. 1-Monooleylglycerol, 1-Monopalmitoylglycerol, 1-Monostearoylglycerol, Dodecanoat, Ethanolamin, Hexadecanoat, Octadecanoat, Octadecanol, Oleat amid, Palmitat), Zuckerphosphate (6-Phosphogluconat, Fructose-6-phosphat, Glucosamin-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat, Ribulose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat), Intermediate des Nukleotid-Metabolismus (Adenosin, Cytosin, Uracil) sowie der Polyamin-Biosynthese (Putrescin, Spermidin, 1,3-Diaminopro-

pan) werden im Isolat Pat2B, verglichen mit dem Isolat Pat2A, in reduzierten Konzentrationen detektiert und weisen ein antiparalleles Verhalten zu den Aminosäuren (Alanin, Aspartat, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Pantothenat, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin) sowie der Lysin-Degradation (Cadaverin, 5-Aminopentanoat, Glutarat) auf. Ferner zeigen zwei Aromaten (Phenylalanin, Tryptophan) einen verringerte Pool-Größen im Isolat Pat2B auf.

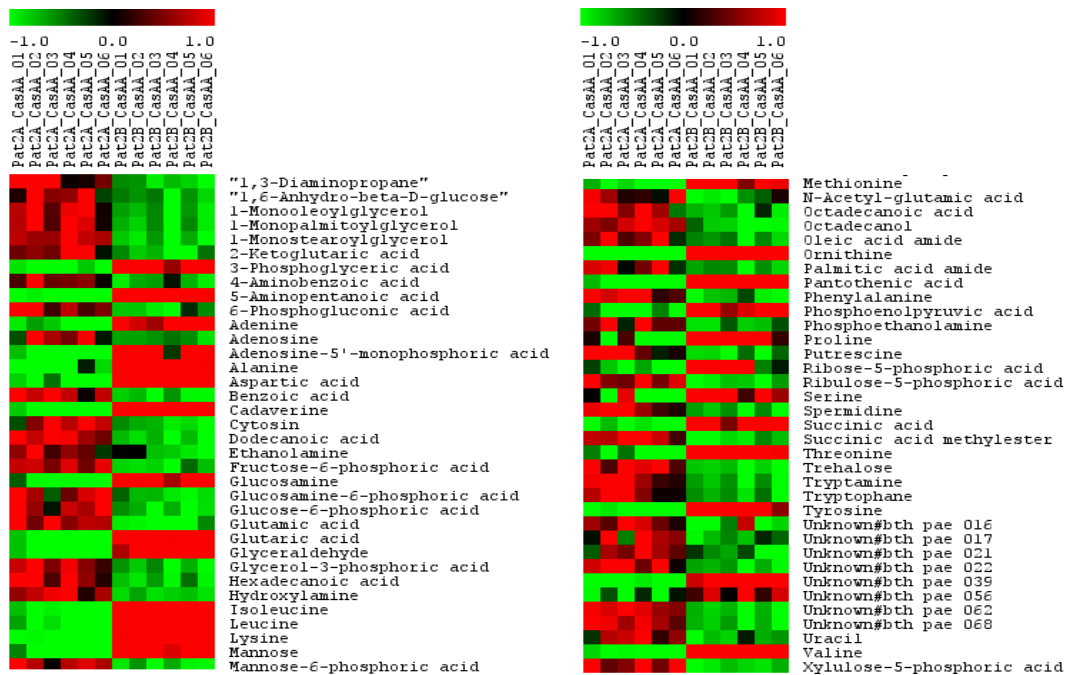


Abb. 88. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B, verglichen mit Pat2A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Das entgegengesetzte Verhalten der Lysin-Degradation und der Aromaten in Pat2B reflektiert eine erhöhte Virulenz, da die Aromaten speziell die Biosynthese des PQS-Systems, das die Expression der Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* kontrolliert, induziert (Palmer et al., 2005). Anhand der Phänotypisierung von Cramer (2009) konnte eine Zunahme sekretierter Virulenzfaktoren (Protease, Pyocyanin, Elastase, hitzestabiles Glycopeptid sowie hitzeinstabile Phospholipase) in einem Intervall von 5 Jahren von Pat2A zu Pat2B ermittelt werden, das die These der erhöhten Virulenz von Pat2B unterstützen würde.

Das im Vergleich zu Pat2A variierte Wachstumsverhalten von Pat2B, vorzeitiger Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (Abb. 76) sowie dessen metabolisches Profil (Abb. 88) deuten, infolge der Reduktion des Fettsäure-Metabolismus sowie der Zuckerphosphate bei Wachstum auf CasAA, auf eine frühzeitige Induktion der stringenten Kontrolle

(Kap. 3.2.4.1), die bereits einen Effekt auf das Metabolom in der exponentiellen Wachstumsphase von Pat2B erzielt haben könnte. Die These der stringenten Kontrolle müsste noch bewiesen werden.

Zudem könnten die deutlich erhöhten Konzentrationen der Metabolite des Fettsäure-Metabolismus, wie bereits bei Pat1A beschrieben (Abb. 85), in Relation mit einer verstärkten Induktion der Lipid A-Synthese bzw. Modifikation stehen und würde die erste Phase der Adaptation von *P. aeruginosa* nach Kolonisation der CF-Lunge repräsentieren.

Vergleich Isolat Pat2C und Pat2A bei Wachstum auf CasAA

In Abbildung 89 wird ein Vergleich zwischen dem frühen und dem späten Isolat von Patient 2 bei Wachstum auf CasAA mit Hilfe eines T-Tests dargestellt. Der relative Gesamtfehler liegt in Pat2C bei 8.1% und in Pat2A bei 11.6%.

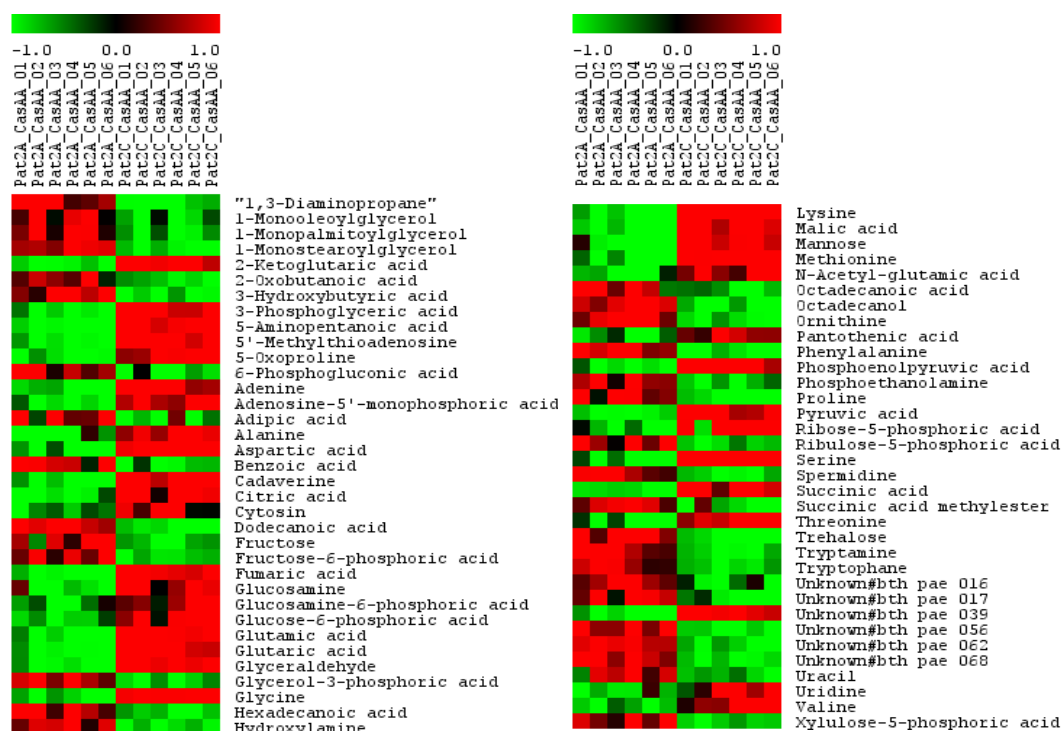


Abb. 89. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C verglichen mit Pat2A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Die metabolischen Profile der Isolate Pat2C und Pat2A im Vergleich weisen ebenfalls eine geringe Korrelation von 0.8 (Tab. 29) auf. Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (1-Monooleylglycerol, 1-Monopalmitoylglycerol, 1-Monostearoylglycerol, Dodecanoat, Hexadecanoat, Octadecanoat, Octadecanol, Phosphoethanolamin), der Aromaten

(Phenylalanin, Tryptophan) und der Osmolyten Trehalose und Prolin werden im Isolat Pat2C, verglichen mit Pat2A, in reduzierten Konzentrationen detektiert (Tab. 79; S. 256-257).

Konträr dazu liegen Intermediate des Zitronensäurezyklus (α -Ketoglutarat, Citrat, Fumarat, Malat, Succinat) und der Vorläufer Pyruvat, der Lysin-Degradation (Cadaverin, 5-Aminopentanoat, Glutarat), 5'-Methylthioadenosin, Aminosäuren (Alanin, Aspartat, Glycin, Lysin, Methionin, Pantothenat, Serin, Valin), Zucker und -Phosphate (Glucosamin, Glucosamin-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Mannose, Phosphoenolpyruvat, Ribose-5-phosphat) im Isolat Pat2C in erhöhten Konzentrationen vor.

Die Akkumulation der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus im Isolat Pat2A könnte das erste Stadium der Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge darstellen.

Das metabolische Profil vom Isolat Pat2C reflektiert eine effizientere Energiebilanz, infolge der verstärkten Zuckerphosphate, der Zitronensäurezyklus-Intermediate sowie Aminosäuren, die mit der erhöhten spezifischen Wachstumsrate (Tab. 25) korreliert.

Außerdem könnte das Isolat Pat2C aufgrund der deutlichen Erhöhung der Aminosäure-Konzentrationen einen verstärkten Aminosäureimport aufweisen, was in Relation mit der längeren Persistenz des Isolats Pat2C im Mucus von CF-Lungen steht.

Anhand der Phänotypisierung von Cramer (2009) und der akkumulierten Intermediate der Lysin-Degradation, von Methionin sowie 5'-Methylthioadenosin könnte eine erhöhte Virulenz in Pat2C vorliegen, die mit dem schweren Krankheitsverlauf von Patient 2 korreliert (vgl. Kap. 3.2.3).

Vergleich Isolat Pat2C und Pat2B bei Wachstum auf CasAA

Die Analyse zwischen dem mittleren und dem späten Isolat von Patient 2 unter Verwendung von CasAA als Medium wird in Abbildung 90 mit Hilfe eines T-Tests dargestellt. Der relative Gesamtfehler von Pat2C bei 8.1% und von Pat2B liegt bei 9.2% (Tab. 80; S. 257-258).

Der Signifikanztest in Abbildung 90 weist geringere Unterschiede in den metabolischen Profilen der Isolate Pat2C und Pat2B auf als in den Analysen von Pat2B mit Pat2A (Abb. 88) und Pat2C mit Pat2A (Abb. 89). Dies reflektiert eine Annäherung des mittleren an das späte Isolat, das allerdings im Kontrast zur kalkulierten Korrelation von 0.55 und zu den Phänotypisierungen von Cramer (2009) steht.

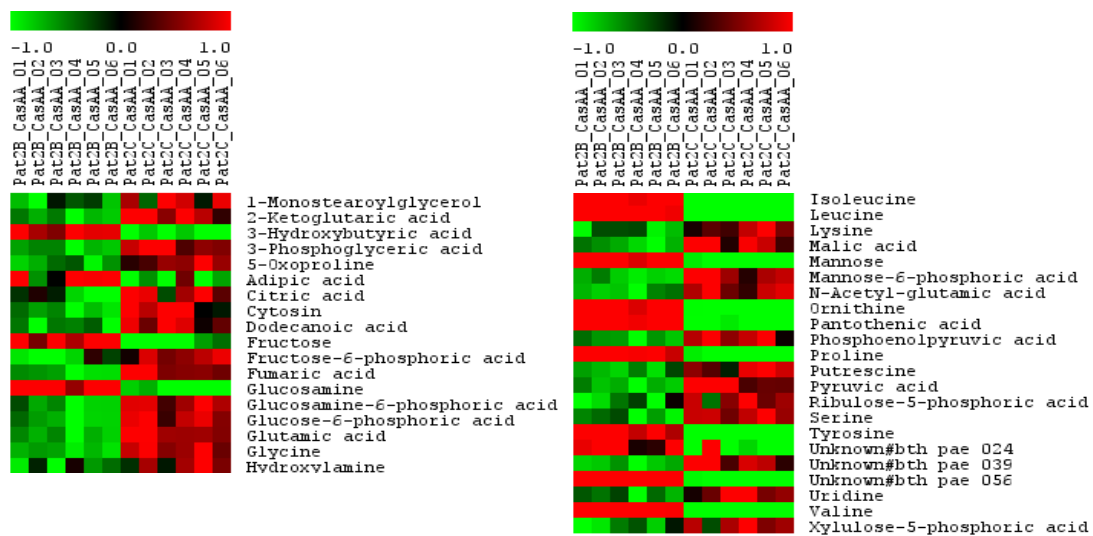


Abb. 90. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C, verglichen mit Pat2B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

In dem Isolat Pat2C, verglichen mit Pat2B, zeigen erhöhte Konzentrationen der Intermediate des Zitronensäurezyklus (α -Ketoglutarat, Citrat, Fumarat, Malat) und des Vorläufers Pyruvat, der Zucker und -Phosphate (Fructose-6-phosphat, Glucosamin-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat, Phosphoenolpyruvat, Ribulose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat), des Pyrimidin-Metabolismus (Cytosin, Uridin) sowie der Fettsäuren (1-Monostearoylglycerol, Dodecanoat) einen erhöhten Energie-Metabolismus und ferner eine effiziente Adaptation des Isolats Pat2C an das ihn umgebende Respirationsmilieu, das mit einer längeren Persistenz im Mucus des CF-Patienten korreliert.

Ein Grund für diese Ineffizienz des Isolats Pat2B könnte die frühzeitige Induktion der stringenten Kontrolle sein. Lediglich einige Aminosäuren (Isoleucin, Leucin, Ornithin, Prolin, Tyrosin, Valin) und Zucker (Fructose, Mannose) weisen erhöhte Konzentrationen in Pat2B auf, so dass das mittlere Isolat von Patient 2 einen Übergangszustand verdeutlicht.

3.2.6.4 Metabolische Profile von *P. aeruginosa*-Isolaten aus Patient 1 und 2 bei Wachstum auf CasAA im Vergleich

Nachfolgend werden die metabolischen Profile der Isolate von Patient 1 und 2 im exponentiellen Wachstum auf dem CasAA-Medium entsprechend ihrer Isolation detaillierter charakterisiert und in erster Linie anhand einer PCA sowie HCA dargestellt und durch korrespondierende Korrelationskoeffizienten ergänzt.

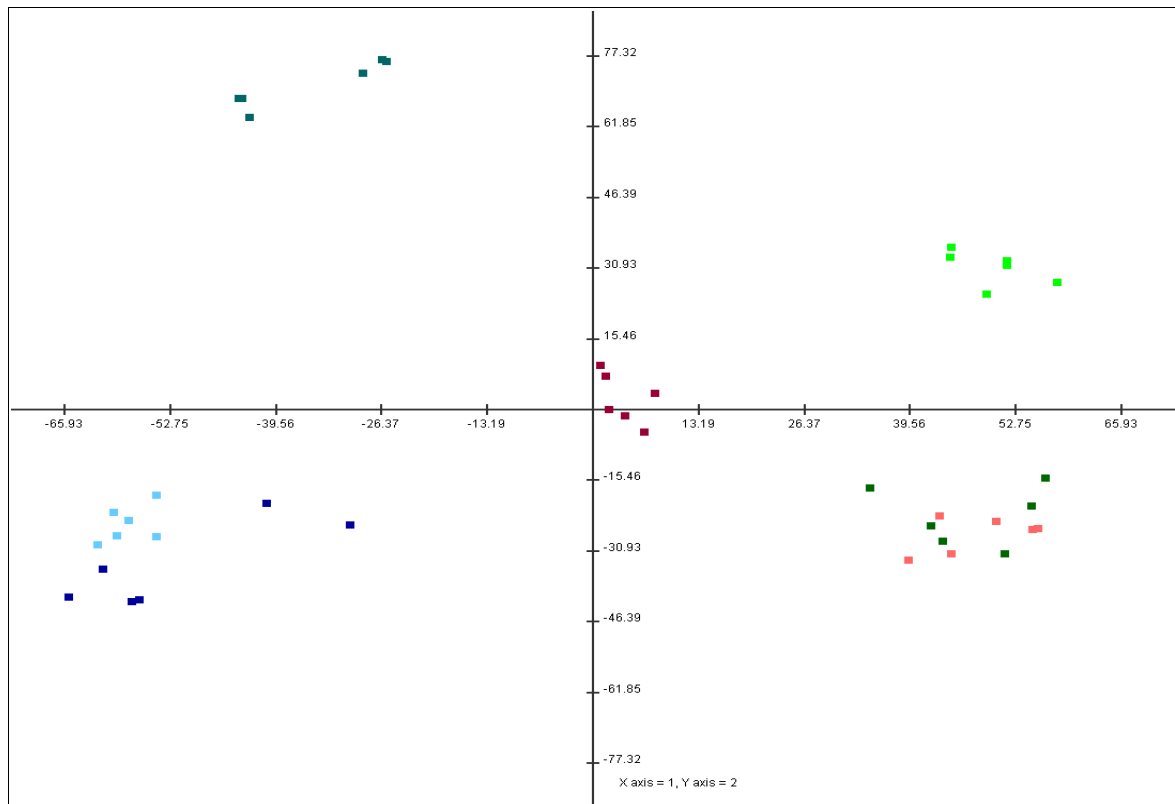


Abb. 91. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Patientenisolate Pat1A (dunkelblau), Pat1B (dunkelgrün), Pat1C (dunkelrot), Pat2A (hellblau), Pat2B (hellgrün) sowie Pat2C (hellrot) auf CasAA-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Gesamtvarianz der Komponenten 1 und 2 beträgt 43 %.

Die PCA in Abbildung 91 soll einen Überblick über die Clusterung der einzelnen Patientenisolate zueinander und zum Referenzstamm PA14 auf dem CasAA-Medium im exponentiellen Wachstum liefern. Deutlich zu erkennen ist die gemeinsame Clusterung der Frühisolate beider Patienten und dem mittleren Isolat von Patient 1 mit dem Spätisolat von Patient 2. Separate Gruppen bilden der Referenzstamm PA14, das Spätisolat von Patient 1 (dunkelrot) sowie das mittlere Isolat von Patient 2 (hellgrün).

Diese Distanzierung von Pat1C könnte mit der erworbenen *lasR*-Mutation und die von Pat2B mit der frühzeitigen Induktion der stringenten Kontrolle begründet werden.

Anhand der HCA in Abbildung 92, die einen Vergleich der Isolate Pat1A-1C sowie Pat2A-2C mit dem Referenzstamm PA14 bei exponentiellem Wachstum auf CasAA beschreibt, kann eine zweigeteilte Clusterung detektiert werden. Das erste Cluster teilt sich in die zwei Untercluster (a) und (b) auf, die einerseits den Referenzstamm PA14 (a) und andererseits die frühen Isolate beider Patienten (b) integrieren. Das zweite Cluster weist eine Gliederung in die zwei Cluster (c) und (d) auf, die das mittlere und späte Isolat des Patienten 1 (c) und des Patienten 2 (d) repräsentieren.

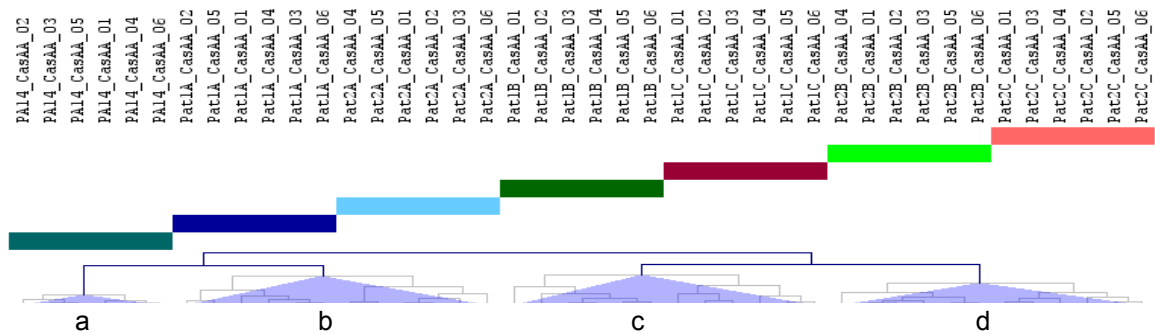


Abb. 92. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Patientenisolates Pat1A (dunkelblau), Pat1B (dunkelgrün), Pat1C (dunkelrot), Pat2A (hellblau), Pat2B (hell-grün) sowie Pat2C (hellrot) auf CasAA-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Buchstaben a-d (lila Dreikante) symbolisieren die Untercluster.

Bei der Betrachtung der kalkulierten Korrelationskoeffizienten in Tabelle 40 ist die Clusterbildung aus der PCA (Abb. 91) sowie HCA (Abb. 92) partiell wiederzuerkennen. In dem Kontext ist die höchste Korrelation mit 0.961 binnen der Frühisolate zu beobachten. Dies könnte einerseits auf einen artverwandten oder adäquaten Ursprung beider Frühisolate und andererseits auf eine Patientenunabhängigkeit hinweisen.

Die Ergebnisse der HCA (Abb. 74) skizzieren, dass die mittleren und späten Isolate in den Jahren der Besiedlung eine Patientenabhängigkeit entwickelt haben. Begründet werden könnte dies mit der gemeinsamen Clusterung der mittleren und späten Isolate des entsprechenden Patienten in der HCA, speziell weil die Patientenisolates auf einem CF-Sputum bzw. Mucus-ähnlichen Medium kultiviert wurden.

Tab. 40. Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums der *P. aeruginosa*-Isolate von Patient 1 und 2 auf CasAA-Medium entsprechend ihrer Isolation

	PA14	Pat1A	Pat1B	Pat1C	Pat2A	Pat2B	Pat2C
PA14	1	0.899	0.890	0.924	0.872	0.687	0.910
Pat1A	0.899	1	0.849	0.919	0.961	0.564	0.915
Pat1B	0.890	0.849	1	0.916	0.840	0.742	0.909
Pat1C	0.920	0.919	0.916	1	0.867	0.635	0.935
Pat2A	0.872	0.961	0.840	0.867	1	0.710	0.838
Pat2B	0.687	0.564	0.742	0.635	0.710	1	0.544
Pat2C	0.910	0.915	0.909	0.935	0.838	0.544	1

Der statistischen Auswertung folgen die T-Test-Analysen der relativen, semiquantitativen Metabolitkonzentrationen der Isolate von Patient 1 und 2 auf CasAA-Medium entsprechend ihrer Isolation, um eine detailliertere Charakterisierung dieser zu erzielen. Die relevanten t- und p-Werte der Vergleiche sind im Anhang aufgeführt (Tab. 81-83; S. 258-261).

Vergleich Isolat Pat2A mit Pat1A bei Wachstum auf CasAA

Die Charakterisierung der Frühisolate beider Patienten bei Wachstum auf CasAA wird in Abbildung 93 mit Hilfe eines T-Tests dargestellt und im Anschluss beschrieben.

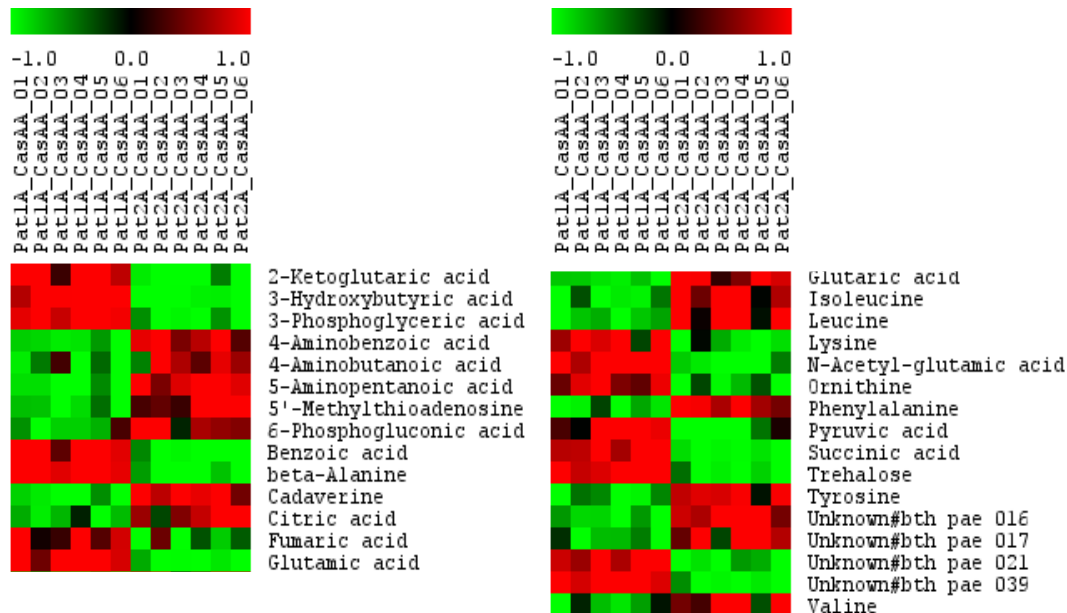


Abb. 93. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2A, verglichen mit Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Die in Abbildung 93 (Tab. 81; S. 258-259) gezeigten verstärkten Konzentrationen der Intermediate der Lysin-Degradation (5-Aminopentanoat, Cadaverin, Glutarat) sowie von 5'-Methylthioadenosin deutet eine erhöhte Virulenz des Isolats Pat2A, verglichen mit Pat1A, an. Dies kann mit der Studie von Bragonzi et al. (2009) verifiziert werden, die besagt, dass das Frühisolat Pat1A die Fähigkeit zur chronischen Persistenz und ferner einen milden Krankheitsverlauf offenbart, wohingegen das Frühisolat Pat2A eine hohe akute Mortalität auszeichnet.

In dem Isolat Pat2A liegen die Intermediate des Zitronensäurezyklus (2-Ketoglutarat, Fumarat, Succinat) und der Vorläufer Pyruvat, mit Ausnahme von Citrat, sowie einige Aminosäuren und -Derivate (β -Alanin, Glutamat, Lysin, N-Acetyl-glutamat, Ornithin) in verminderten Konzentrationen vor, was eine verringerte Biomasseproduktion anzeigt.

In Folge der geringen Varianzen in den relativen, semiquantitativen Konzentrationen, dargestellt in Abbildung 93, kann die Hypothese des artverwandten oder adäquaten Ursprungs beider Frühisolate und die Patientenunabhängigkeit gestützt werden.

Vergleich Isolat Pat2B mit Pat1B bei Wachstum auf CasAA

Die Charakterisierung der mittleren Isolate beider Patienten unter Verwendung von CasAA wird in Abbildung 94 mit Hilfe eines T-Tests dargestellt und folgend beschrieben.

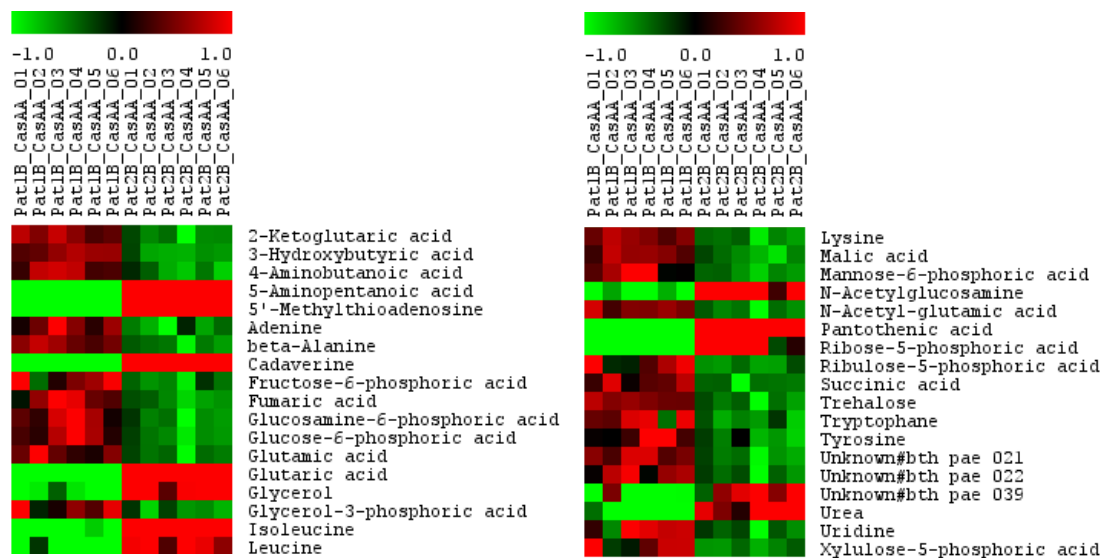


Abb. 94. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B, verglichen mit Pat1B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Ein azyklisches Verhalten weisen die mittleren Isolate beider Patienten auf, verdeutlicht anhand der PCA (Abb. 91) und HCA (Abb. 92), verifiziert durch den kalkulierten Korrelationskoeffizienten von 0.742.

Das metabolische Profil des Isolats Pat2B, verglichen mit dem Isolat Pat1B (Tab. 82; S. 259-260), reflektiert anhand der verstärkten Konzentrationen der Lysin-Degradation (5-Aminopentanoat, Cadaverin, Glutarat), von 5'-Methylthioadenosin sowie der verminderten Konzentrationen der Aromaten (Tryptophan, Tyrosin), infolge der aktiven *Pseudomonas*-Quinolone-Signal-Biosynthese (vgl. Kap. 3.2.2.1; Abb. 45), eine erhöhte Virulenz. Dies korreliert mit dem schwereren Krankheitsverlauf von Patient 2 (Cramer, 2009).

Die frühzeitige Induktion der stringenten Kontrolle in dem Isolat Pat2B, verglichen mit dem Isolat Pat1B, kann bei Wachstum auf CasAA in Relation mit sowohl der Verminderung der Intermediate des Zitronensäurezyklus (2-Ketoglutarat, Fumarat, Malat, Succinat) als auch von phosphorylierten Komponenten (Fructose-6-phosphat, Glucosamin-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Glycerol-3-phosphat, Mannose-6-phosphat, Ribulose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat), gefolgt von einem reduzierten Energie-Metabolismus sowie Biomasseproduktion, gesetzt werden.

Vergleich Isolat Pat2C mit Pat1C bei Wachstum auf CasAA

Die Charakterisierung der Spätisolate beider Patienten bei Wachstum auf CasAA wird in Abbildung 95 mit Hilfe eines T-Tests dargestellt und folgend beschrieben.

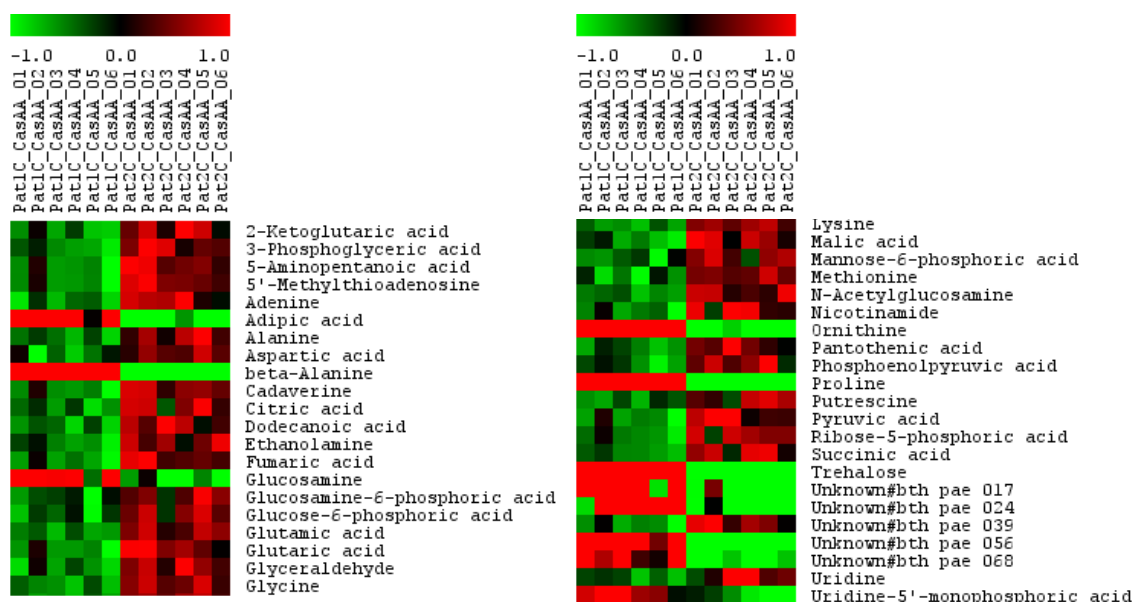


Abb. 95. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C verglichen mit Pat1C auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Für den Signifikanztest (Abb. 95; Tab. 83; S. 260-261) der Spätisolate Pat1C und Pat2C wird eine Korrelation von 0.935 berechnet. Dies deutet auf Unterschiede in dem Metabolom der untersuchten Isolate hin und kann mit dem T-Test bestätigt werden.

Im Isolat Pat2C, verglichen mit Pat1C, liegen nur wenige in signifikant verringerten Konzentrationen detektierte Metabolite vor. Auffällig ist das antiparallele Verhalten von β -Alanin zu seinem Folgeprodukt Pantothenat. Pantothenat, Synonym für Vitamin B₅, kann in CoenzymA (CoA) enzymatisch konvertiert werden und stellt folglich die Basis des Metabolismus und der Synthese von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten dar. Ferner weist das Isolat Pat2C erhöhte Konzentrationen der Zitronensäurezyklus-Intermediate (2-Ketoglutarat, Citrat, Fumarat, Malat, Succinat), der Zucker und -Phosphate (3-Phosphoglycerat, Glucosamin, Glucosamin-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat, Phosphoenolpyruvat, Ribose-5-phosphat), der Aminosäuren (Alanin, Aspartat, Glutamat, Glycin, Lysin, Methionin), Nicotinamid, Nukleotide (Adenin, Uridin), der Lysin-Degradation (5-Aminopentanoat, Cadaverin, Glutarat) und von 5'-Methylthioadenosin auf. Dieses metabolische Profil des Isolats Pat2C wird durch die signifikant gestiegene Wachstumsrate (Tab. 26) unterstützt und zeigt eine effiziente Energieeffizienz an.

Diese Konzentration an Metaboliten in dem Isolat Pat2C, verglichen mit Pat1C, reflektiert eine effektive Adaptation an das ihn umgebende native Medium, folglich an den Mucus einer CF-Lunge im Respirationstrakt von Patient 2.

Im Anschluss werden die *P. aeruginosa*-Isolate der Patienten 1 und 2 während des exponentiellen Wachstums auf Glucose-Methionin-Medium näher analysiert, um mögliche Analogien oder Differenzen zwischen den Medien und der Isolate herauszustellen.

3.2.6.5 Metabolische Profile von *P. aeruginosa*-Isolaten aus Patient 1 im Vergleich zu PA14 bei Wachstum auf Glucose-Methionin

Für eine detailliertere Charakterisierung der einzelnen Isolate des Patienten 1 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose-Methionin-Medium werden zunächst die Proben von Pat1A-1C mit PA14 anhand einer PCA visualisiert (Abb. 96).

Die in Abbildung 78 gezeigte PCA beschreibt eine Gesamtvarianz der ersten und zweiten Komponente von 56 %.

Deutlich zu erkennen ist die Separierung der einzelnen Isolate und des Referenzstammes PA14. Die Patientenisolate weisen untereinander eine geringere Distanz auf als zu PA14.

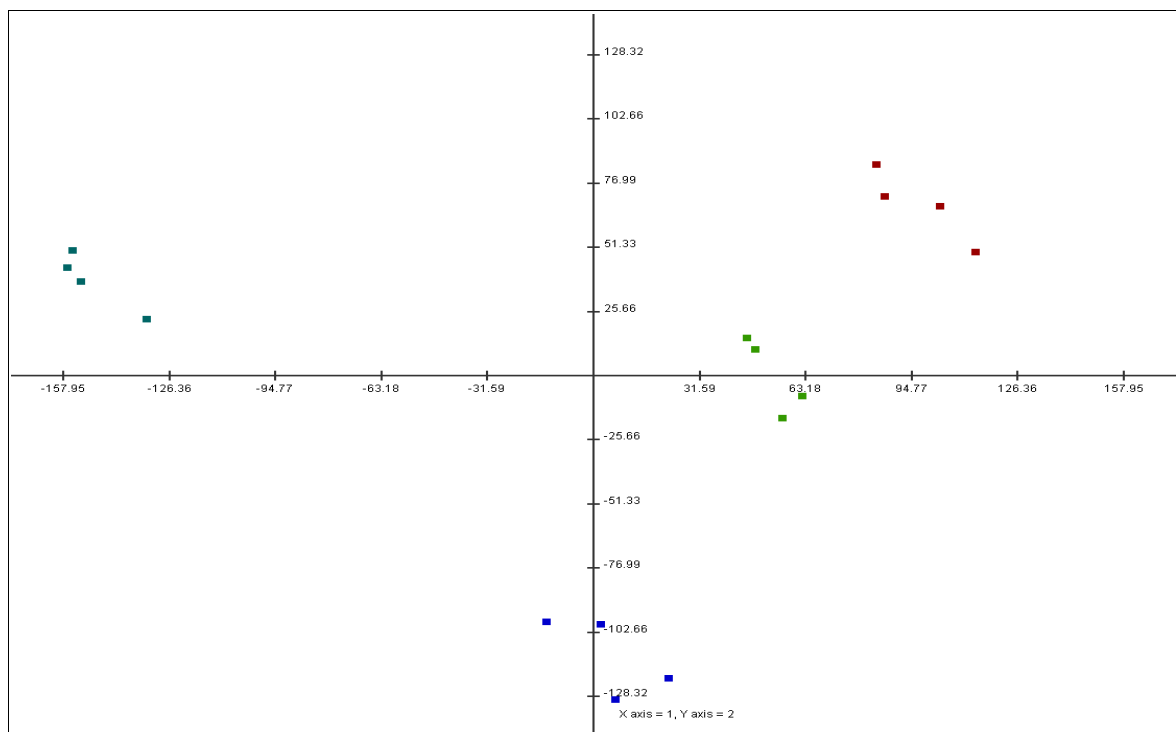


Abb. 96. Vergleich von PA14 (petrol) mit den Patientenisolaten Pat1A (blau), Pat1B (grün) sowie Pat1C (rot) auf Glucose-Methionin-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Gesamtvarianz der Komponenten 1 und 2 beträgt 56%.

Werden die für die PCA verwendeten Proben in einer HCA (Abb. 97) abgebildet, reflektieren diese ein äquivalentes Muster zu den Ergebnissen der PCA. In der HCA bilden sich zwei Hauptcluster. Das erste Hauptcluster setzt sich aus den Proben des Referenzstammes PA14 und das zweite Hauptcluster aus den Proben der drei Isolate Pat1A-1C zusammen, wobei ein Untercluster des zweiten Hauptclusters aus den Isolaten Pat1A und Pat1B gebildet wird und die *lasR*-Mutante (Pat1C) ein separates Untercluster darstellt.

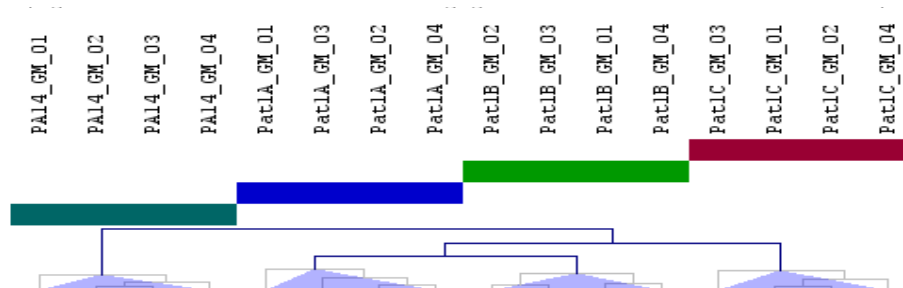


Abb. 97. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Patientenisolate Pat1A (blau), Pat1B (grün) sowie Pat1C (rot) auf Glucose-Methionin-Medium in der exponentiellen Wachstumsphase.

Die Kombination der Ergebnisse der PCA (Abb. 96), HCA (Abb. 97) sowie die kalkulierten Korrelationen nach Pearson (Tab. 41) zeigen signifikante Varianzen zwischen den Isolaten Pat1A-1C und dem Ursprung PA14 auf. Dabei weist der Vergleich der Korrelationen von Pat1A zu PA14 mit einem Wert von 0.36 den prägnantesten Unterschied auf. Die Korrelationen von Pat1B (0.75) und Pat1C (0.73), verglichen mit Pat1A, symbolisieren eine Annäherung an den Referenzstamm PA14 an. Die Isolate Pat1B und Pat1C weisen untereinander die höchste Korrelation von 0.92 auf.

Tab. 41. Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums auf Glucose-Methionin von PA14 sowie der Isolate Pat1A-1C unter Angabe des relativen Gesamtfehlers der Metabolitkonzentrationen.

	PA14	Pat1A	Pat1B	Pat1C	Relativer Gesamtfehler
PA14	1	0.36	0.75	0.73	8.8%
Pat1A	0.36	1	0.85	0.8	18.0%
Pat1B	0.75	0.85	1	0.92	10.5%
Pat1C	0.73	0.8	0.92	1	12.3%

Infolge der deutlichen Trennung der drei Isolate des Patienten 1 von PA14 sowie der höheren Korrelationen der Isolate untereinander wird eine gemeinsame Analyse anhand einer BETR (Bayesian Estimation of Temporal Regulation) (Abb. 98) durchgeführt. Eine BETR betrachtet die Isolate von Patient 1 entsprechend ihrer Isolation als Zeitreihe.

Die Betrachtung der in Abbildung 98 dargestellten BETR reflektiert die detektierten Varianzen in der PCA (Abb. 96), HCA (Abb. 97) sowie in den Korrelationskoeffizienten (Tab. 41).

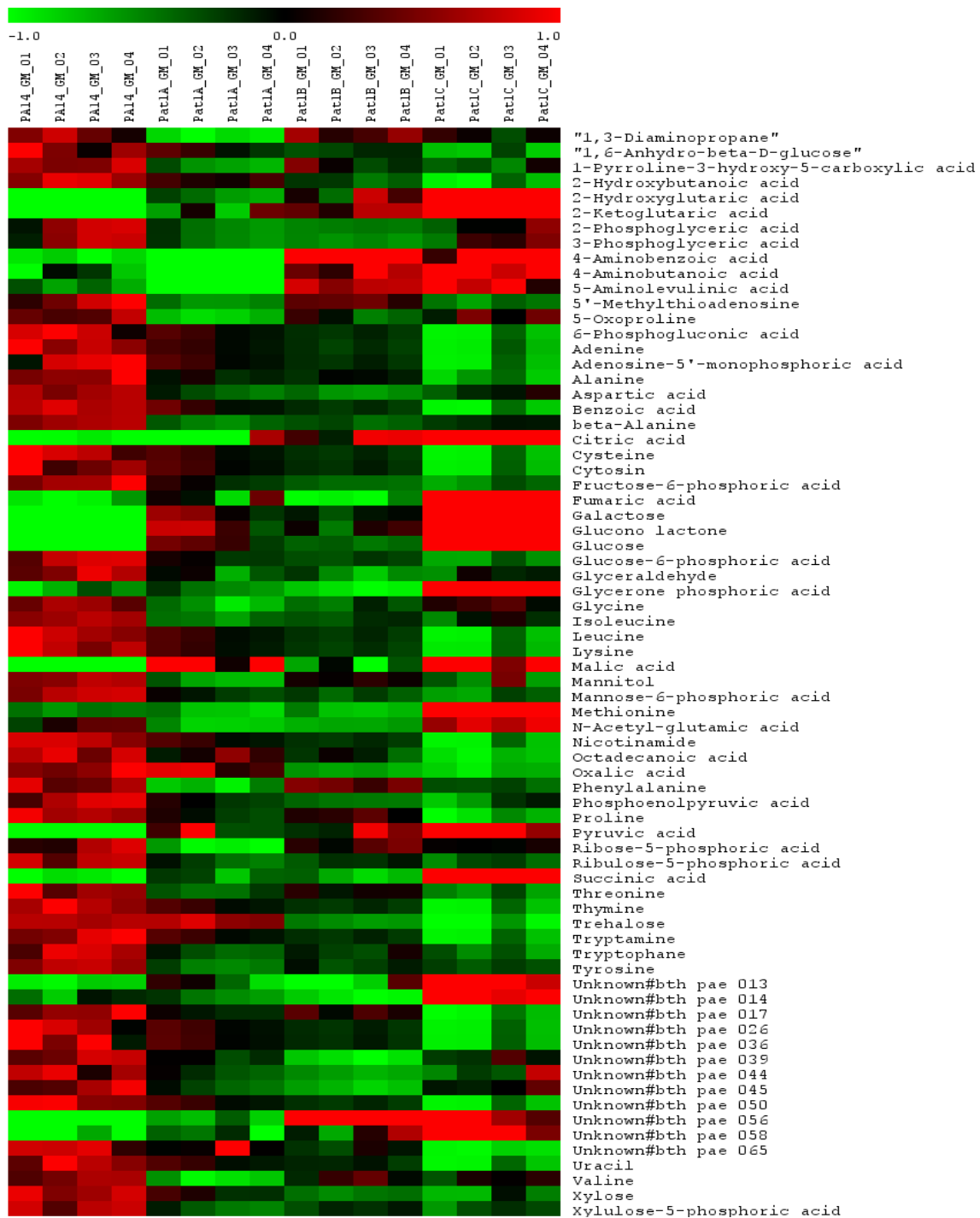


Abb. 98. Signifikante Änderungen anhand einer BETR des Referenzstammes PA14 und der Patientenisolat Pat1A, Pat1B sowie Pat1C auf Glucose-Methionin-Medium. Die Parameter waren: 1 Bedingung, 4 Zeitpunkte, Signifikanzlevel von $\alpha=0,01$. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

In der exponentiellen Wachstumsphase auf Glucose-Methionin-Medium resultiert eine signifikante Verminderung der Intermediate des AHL-Metabolismus (5'-Methylthioadenosin), der Aminosäuren (Alanin, Aspartat, β -Alanin, Cystein, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Valin), der Zucker und -Phosphate (1,6-Anhydro- β -D-glucose, 2-Phosphoglycerat, 3-Phosphoglycerat, 6-Phosphoglycerat, Fructose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Glyceronphosphat, Mannose-6-phosphat, Phosphoenolpyruvat, Ribose-5-phosphat, Ribulose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat), Nicotinamid, Intermediate des Nukleotid-Metabolismus (Adenin, AMP, Cytosin, Thymin, Uracil) sowie sieben unbekannte Verbindungen in den Isolaten von Patient 1, verglichen mit PA14.

Dieser grobe Überblick über die metabolischen Profil der Isolate von Patient 1 könnte auf einen ineffizienten Aminosäureimport sowie Energie-Metabolismus hinweisen. Diese Vermutung kann mit der reduzierten spezifischen Wachstumsrate der Isolate Pat1A ($\mu=0.84\text{h}^{-1}$), Pat1B ($\mu=0.90\text{h}^{-1}$) und Pat1C ($\mu=0.83\text{h}^{-1}$), verglichen mit PA14 ($\mu=1.17\text{h}^{-1}$), gestützt werden (Abb. 77, Tab. 36).

Das metabolische Muster der Isolate könnte ferner eine ineffiziente Adaptation an die Kultivierung auf dem Minimalmedium mit Glucose und Methionin skizzieren. Bestätigt werden könnte dies mit dem reduzierten Metabolismus des Isolats Pat1A und größtenteils des Isolats Pat1B im Vergleich zu PA14.

Allerdings zeigt das Isolat Pat1B nicht nur Übereinstimmungen im metabolischen Profil mit Pat1A sondern auch mit Pat1C, und das repräsentiert folglich einen Übergangszustand.

Außerdem kann ein sich über 16 Jahre hinweg vollziehender Wandel im Metabolismus der Isolate von Patient 1, verglichen mit dem Ursprung PA14, beobachtet werden, der mit der Akkumulation der Intermediate des Zitronensäurezyklus (2-Ketoglutarat, Citrat, Fumarat, Malat, Succinat) und des Vorläufers Pyruvat, von Methionin sowie 5-Aminolevulinat erklärt werden kann. 5-Aminolevulinat stellt die Vorstufe der Tetrapyrrole, zu denen die proteingebundene prosthetische Gruppe Häm zählt, dar. Häme stellen essentielle Cofaktoren von Proteinen dar, die in aeroben und anaeroben Atmungsprozessen (Atmungskettenphosphorylierung) involviert sind, und dienen der zellulären Energiegewinnung. Eine Akkumulation der Häm-Biosynthese korreliert folglich mit einem erhöhten Energie-Metabolismus und könnte mit den verstärkt vorliegenden Intermediaten des Zitronensäurezyklus belegt werden.

Dieser Wandel im Metabolismus von Pat1C verglichen mit Pat1A und Pat1B, der sich über 16 Jahren hinweg vollzieht, deckt sich mit der längeren Persistenz des Spätisolats im

Respirationstrakt. Die Induktion der Häm-Biosynthese über 5-Aminolevulinat und des Zitronensäurezyklus könnten einen Überlebensvorteil sowie eine effiziente Adaptation des Spätisolats darstellen. Ferner steht die Erhöhung des Methionin-Pools in Pat1C in Relation mit der erworbenen Methionin-Auxotrophie.

Bei der Analyse der T-Tests der Patientenisolats untereinander, Ergebnisse im Anhang (Tab. 84-86; S. 262-264) zusammengefasst, ergeben sich geringe Varianzen im Metabolismus, die sich zentral auf den AHL-Metabolismus (Cystein- und Methionin-Metabolismus), die Aminosäuren, den Zitronensäurezyklus, die Häm-Biosynthese sowie Zucker und -Phosphate beschränken.

In dem Isolat Pat1B, verglichen mit dem Isolat Pat1A, werden, wie bereits bei Wachstum auf CasAA (vgl. Kap. 3.2.4.2, Abb. 67), ein verstärkter AHL-Metabolismus sowie des Cystein- und Methionin-Metabolismus detektiert, was einen Rückschluss auf eine erhöhte Virulenz von Pat1B im Vergleich mit Pat1A zulässt. Diese Vermutung deckt sich mit der Studie von Bragonzi et al. (2009), in der die Fähigkeit der *P. aeruginosa*-Isolate beschrieben wurde, selbst nach Jahren der Persistenz im Wirt chronische Lungeninfektionen zu verursachen. Mit den Ergebnissen der Phänotypisierung von Cramer (2009) konnte eine erhöhte Sekretion von Virulenzfaktoren bei Pat1B ermittelt werden, was die Hypothese der erhöhten Virulenz von Pat1B stützt.

3.2.6.6 Metabolische Profile von *P. aeruginosa*-Isolaten aus Patient 2 bei Wachstum auf Glucose-Methionin im Vergleich

Um die metabolischen Profile der Isolate Pat2A-2C nach Kultivierung auf dem Glucose-Methionin-Medium untereinander charakterisieren zu können, werden die Analysen mittels T-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 99-101 dargestellt und die relevanten t- und p-Werte der Vergleiche im Anhang aufgeführt (Tab. 87-89; S. 264-267). Die kalkulierten Korrelationen der Patientenisolats Pat2A-2C sowie der relative Gesamtfehler der Metabolitkonzentrationen werden in Tabelle 42 angegeben.

Tab. 42. Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums auf Glucose-Methionin der Patientenisolats Pat2A-2C unter Angabe des relativen Gesamtfehlers der Metabolitkonzentrationen

	Pat2A	Pat2B	Pat2C	Relativer Gesamtfehler
Pat2A	1	0.61	0.52	11.6%
Pat2B	0.61	1	0.97	9.2%
Pat2C	0.52	0.97	1	8.1%

Vergleich Isolat Pat2B mit Pat2A bei Wachstum auf Glucose-Methionin

In Abbildung 99 wird ein Vergleich zwischen dem mittleren und frühen Isolat von Patient 2 unter Verwendung von Glucose-Methionin als Medium mit Hilfe eines T-Tests visualisiert.

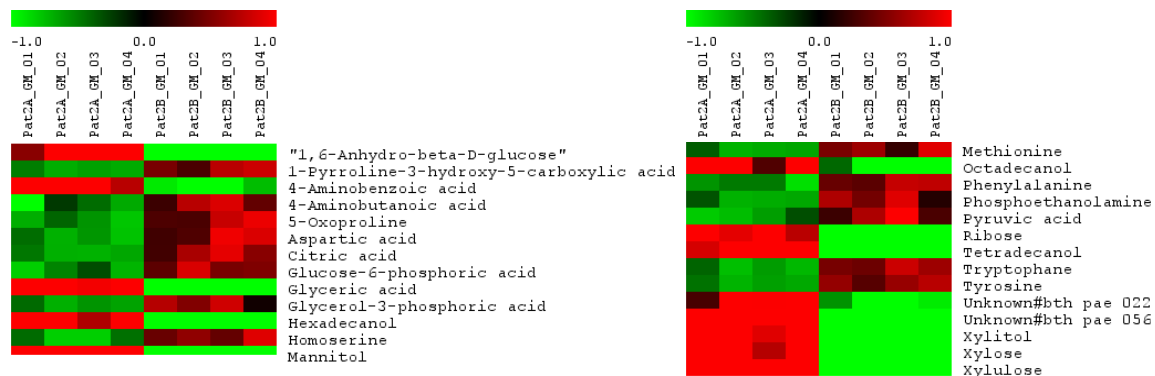


Abb. 99. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B, verglichen mit Pat2A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Die metabolischen Profile der Isolate Pat2B und Pat2A (Tab. 87; S. 264-265) in der exponentiellen Wachstumsphase auf dem Glucose-Methionin-Medium zeigen geringe Varianzen im Metabolismus (Abb. 99), die vom kalkulierten Korrelationskoeffizienten von 0.61 abweichen.

In dem Isolat Pat2B liegen Zucker, -alkohole (1,6-Anhydro- β -D-glucose, Mannitol, Ribose, Xylitol, Xylose, Xylulose), Intermediate des Fettsäure-Metabolismus (Hexadecanol, Octadecanol, Tetradecanol) sowie zwei unbekannte Verbindungen in verringerten Konzentrationen vor.

Intermediate des Zitronensäurezyklus und Vorläufer (Citrat, Pyruvat), des AHL-Metabolismus, Cystein- und Methionin-Metabolismus, Aminosäuren (5-Oxoprolin, Aspartat, Homoserin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) sowie Glucose-6-phosphat weisen erhöhte Konzentrationen im Isolat Pat2B, verglichen mit Pat2A, auf.

Das metabolische Muster von Pat2B deutet auf einen geringen Vorteil in der Energiebilanz, infolge der Verminderung von Glucose-6-phosphat sowie der Aminosäuren, hin.

Auffallend sind, wie bereits bei Wachstum auf CasAA beschrieben (vgl. Kap. 3.2.6.2), die erhöhten Intermediate des Fettsäure-Metabolismus im Frühisolat, verglichen mit dem mittleren (Abb. 99) sowie späten Isolat (Abb. 100) unter Verwendung von Glucose-Methionin als Medium. Allerdings wurden die Intermediate des Fettsäure-Metabolismus in einer geringeren Anzahl bei Wachstum auf Glucose-Methionin detektiert. Dieses Bild lässt Rückschlüsse auf eine mögliche induzierte Adaptation an das Glucose-Methionin-Medium

ziehen. Methionin dient dabei als zusätzliche Nahrungsquelle und stellt eine für das Überleben der Isolate notwendige und präferierte Aminosäure dar, die auch im Mucus von CF-Patienten vorliegt.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Phänotypisierung (Cramer, 2009), die einen Anstieg in der Sekretion der Virulenzfaktoren innerhalb der ersten 5 Jahre der chronischen Infektion mit *P. aeruginosa* aufzeigen, kann eine erhöhte Virulenz von dem Isolat Pat2B, infolge des verstärkten AHL-Metabolismus von Pat2B, verglichen mit dem Isolat Pat2A, belegt werden.

Ein adäquates metabolisches Muster zu Abbildung 99 repräsentiert der Vergleich der Isolate Pat2C und Pat2A (Abb. 100; Tab. 88; S. 265-266), lediglich mit verstärkter Präsenz der bereits erwähnten Stoffwechselwege. Daher wird nicht detaillierter auf die Gegenüberstellung dieser Profile eingegangen.

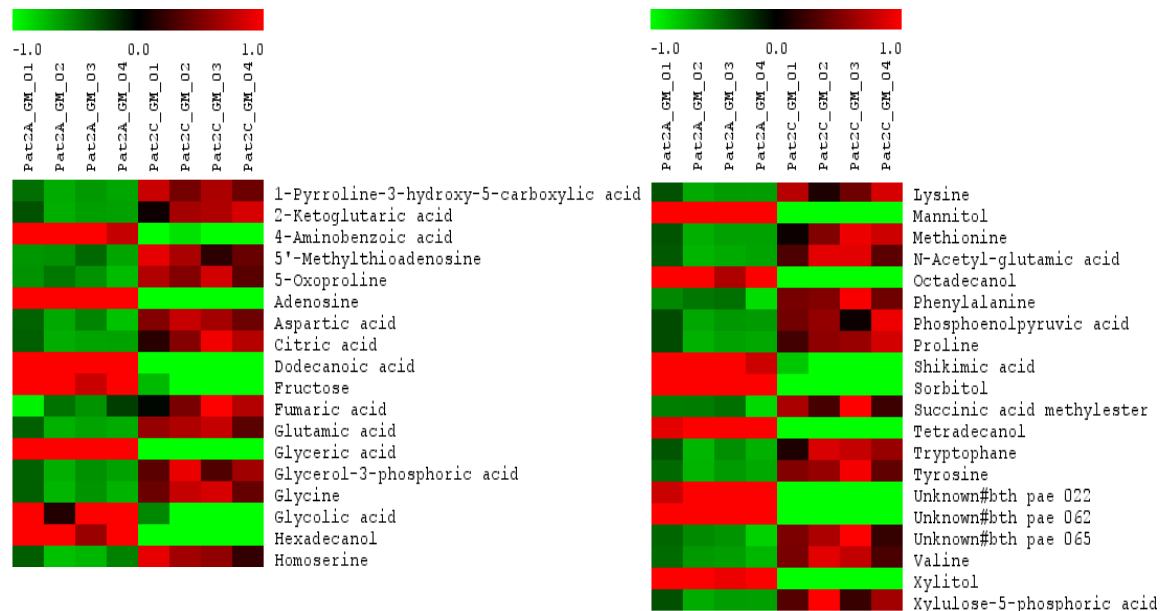


Abb. 100. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C, verglichen mit Pat2A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Vergleich Isolat Pat2C mit Pat2B bei Wachstum auf Glucose-Methionin

Abbildung 101 visualisiert den Vergleich zwischen dem späten und mittleren Isolat von Patient 2 bei Wachstum auf Glucose-Methionin mit Hilfe eines T-Tests (Tab. 89; S. 266). Der kalkulierte Korrelationskoeffizient weist einen Wert von 0.97 auf, was sich mit der geringen Anzahl an signifikant veränderten Metaboliten binnen des Vergleichs deckt.

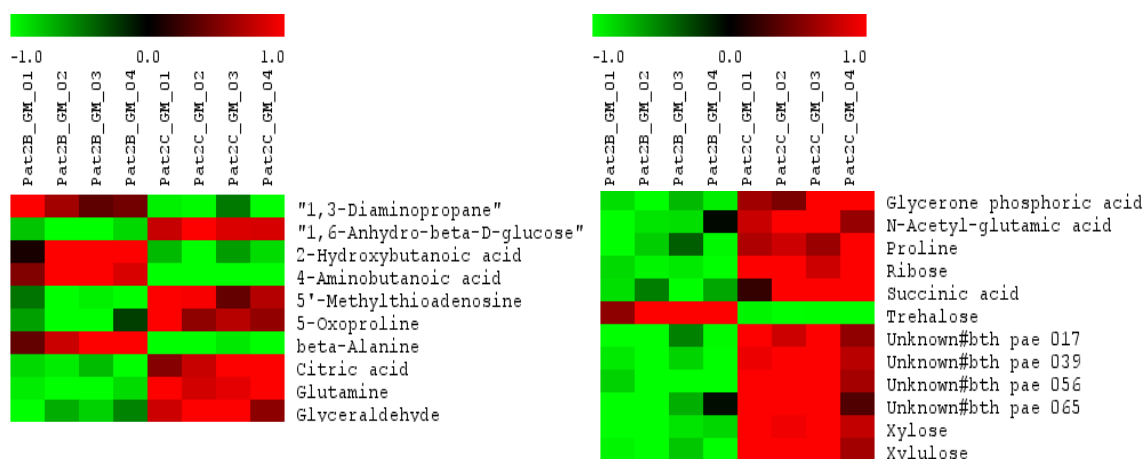


Abb. 101. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C, verglichen mit Pat2B auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Die in Abbildung 101 dargestellte T-Test-Analyse zwischen den Isolaten Pat2C und Pat2B weist auf eine effiziente Adaptation von Pat2C an das ihn umgebende Milieu hin, da ein erhöht detektierter Pool an Intermediaten des Zitronensäurezyklus (Citrat, Succinat), Zuckern (1,6-Anhydro- β -D-Glucose, Glyceronphosphat, Ribose, Xylose, Xylulose) sowie an Aminosäuren (5-Oxoprolin, Glutamin, N-Acetyl-glutamat, Prolin) nachgewiesen werden konnte.

Abbildung 101 veranschaulicht die zentrale Fragestellung nach der Bedeutung unbekannter Komponenten, aufgrund derer potentiell Rückschlüsse auf das Metabolom gezogen werden könnte.

3.2.6.7 Metabolische Profile von *P. aeruginosa*-Isolaten aus Patient 1 und 2 bei Wachstum auf Glucose-Methionin im Vergleich

Nachfolgend werden die metabolischen Profile der Isolate von Patient 1 und 2 im exponentiellen Wachstum auf dem Glucose-Methionin-Medium entsprechend ihrer Isolation charakterisiert und in erster Linie anhand einer PCA in Abbildung 84 dargestellt.

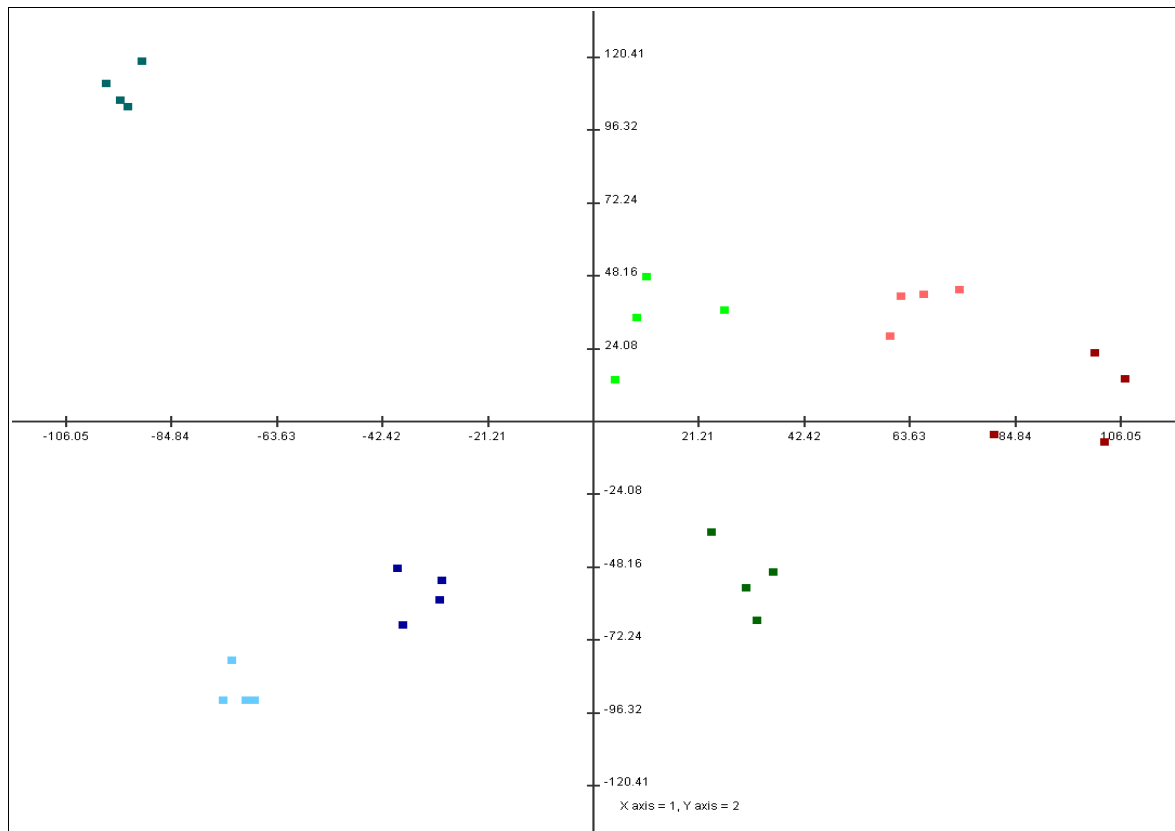


Abb. 102. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Isolate Pat1A (dunkelblau), Pat1B (dunkelgrün), Pat1C (dunkelrot), Pat2A (hellblau), Pat2B (hellgrün) sowie Pat2C (hellrot) auf Glucose-Methionin-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Gesamtvarianz der Komponenten 1 und 2 beträgt 43 %.

Die PCA (Abb. 102) gewährt einen Überblick über die Clusterung der einzelnen *P. aeruginosa*-Isolate von Patient 1 und 2 zueinander sowie zu dem Referenzstamm PA14 unter Verwendung von Glucose-Methionin als Medium in der exponentiellen Wachstumsphase.

Deutlich zu erkennen ist eine Separierung des Referenzstammes von den Isolatzen beider Patienten. Die Isolate bilden ein gemeinsames Cluster aus, in dem jedes Isolat ein Untercluster formt.

Anhand der HCA in Abbildung 103, die einen Vergleich von je drei *P. aeruginosa*-Isolaten von zwei CF-Patienten mit dem Referenzstamm PA14 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose-Methionin beschreibt, kann eine zweigeteilte Clusterung beobachtet werden.

Diese zwei Hauptcluster bilden zwei Untercluster: einerseits (a) und (b) sowie andererseits (c) und (d), dabei repräsentiert (a) den Referenzstamm PA14, (b) die zwei Frühisolate, (c) die zwei mittleren Isolate und (d) die Spätisolate beider Patienten.

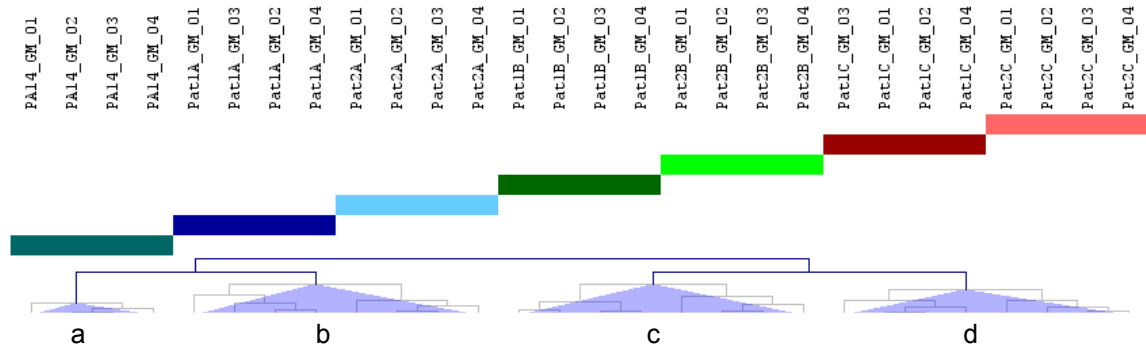


Abb. 103. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Patientenisolate Pat1A (dunkelblau), Pat1B (dunkelgrün), Pat1C (dunkelrot), Pat2A (hellblau), Pat2B (hellgrün) sowie Pat2C (hellrot) auf CasAA-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Buchstaben a-d (lila Dreiecke) symbolisieren die Untercluster.

Auffallend ist das alternierende Verhalten der auf Glucose-Methionin gewachsenen Kulturen von PA14 sowie der Isolate von Patient 1 und 2 zu denen auf CasAA gewachsenen Kulturen. Die Cluster (a) und (b) weisen im Vergleich einen analogen Charakter zu CasAA-Kulturen auf. Die mittleren (c) und späten (d) Isolate beider Patienten clustern entsprechend ihrer Isolation bei Wachstum auf Glucose-Methionin und nicht nach Patient wie unter Verwendung von CasAA erfolgt.

Tab. 43. Paerson Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums der Isolate von Patient 1 und 2 auf Glucose-Methionin-Medium.

	PA14	Pat1A	Pat1B	Pat1C	Pat2A	Pat2B	Pat2C
PA14	1	0.373	0.777	0.662	0.291	0.911	0.940
Pat1A	0.373	1	0.858	0.831	0.925	0.690	0.558
Pat1B	0.777	0.858	1	0.891	0.770	0.956	0.887
Pat1C	0.662	0.831	0.891	1	0.769	0.850	0.811
Pat2A	0.291	0.925	0.770	0.769	1	0.606	0.515
Pat2B	0.911	0.690	0.956	0.850	0.606	1	0.966
Pat2C	0.940	0.558	0.887	0.811	0.515	0.966	1

Bei der Betrachtung der kalkulierten Korrelationskoeffizienten in Tabelle 43 ist die Clusterbildung aus der PCA (Abb. 102) sowie HCA (Abb. 103) partiell wiederzuerkennen. Die höchste Korrelation mit 0.966 ist bei dem mittleren und Spätisolat von Patient 2 zu beobachten, die im Kontrast zu den Ergebnissen der HCA steht. Außerdem erzielt das Spätisolat von Patient 2 mit dem Referenzstamm PA14 eine hohe Korrelation von 0.94. Dies könnte auf eine Entwicklung des Isolats Pat2C in Richtung des Referenzstammes hinweisen. Zusätzlich könnte eine hohe Korrelation von 0.925 der Frühisolate beider

Patienten einerseits auf einen artverwandten oder adäquaten Ursprung der Frühisolate und andererseits auf eine Patientenunabhängigkeit hindeuten. Ebenfalls ergab die Berechnung der Korrelation für Pat1B und Pat2B einen hohen Wert von 0.956, die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PCA (Abb. 102) und HCA (Abb. 103) gebracht werden kann.

Den statistischen Auswertungen folgen die T-Test-Analysen der relativen, semiquantitativen Metabolitkonzentrationen der Isolate von Patient 1 und 2 auf Glucose-Methionin entsprechend ihrer Isolation, um eine detailliertere Charakterisierung dieser zu erzielen. Die t- und p-Werte der Vergleiche sind im Anhang aufgeführt (Tab. 90-92; S. 267-269).

Vergleich Isolat Pat2A mit Pat1A bei Wachstum auf Glucose-Methionin

Die Charakterisierung der Frühisolate beider Patienten unter Verwendung von Glucose-Methionin wird in Abbildung 104 (Tab. 90; S. 267) mittels T-Test dargestellt und anschließend erläutert.

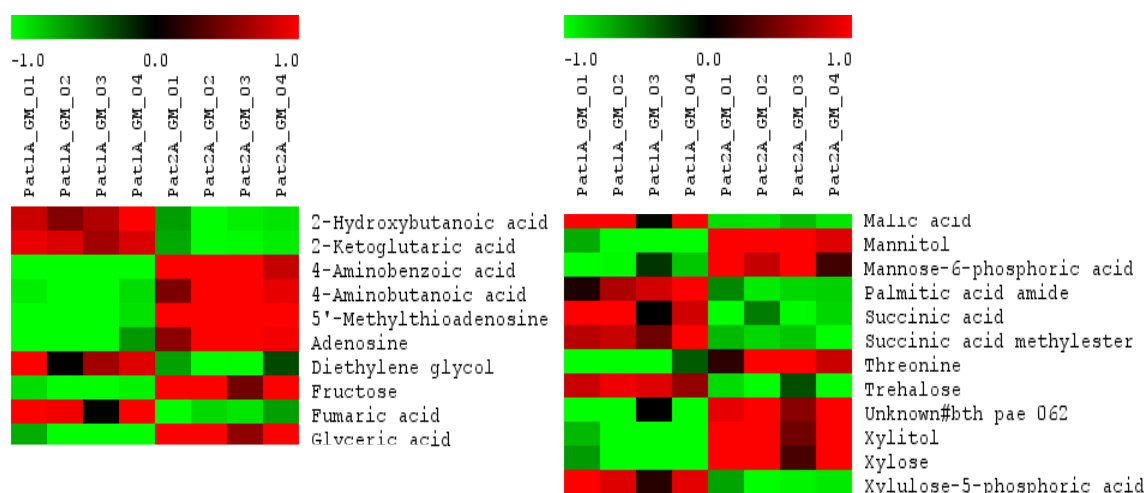


Abb. 104. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2A, verglichen mit Pat1A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Für den Vergleich der Frühisolate beider Patienten konnte ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0.925 ermittelt werden. Dieser deckt sich mit der geringen Anzahl an detektierten Varianzen im metabolischen Profil der beiden Frühisolate Pat2A und Pat1A (Abb. 104). Die Varianzen beschränken sich speziell auf den Zitronensäurezyklus, den AHL-Metabolismus sowie auf wenige Alkohole, Fettsäuren, Zucker- und ihre Phosphate. Die in Pat2A detektierte Reduktion der Intermediate des Zitronensäurezyklus sowie von

Trehalose könnte eine verminderte Energiebilanz reflektieren, wohingegen die Erhöhung des AHL-Metabolismus in Relation mit einer leicht verstärkten Virulenz des Frühisolates stehen könnte. Letzteres korreliert mit dem leichten Krankheitsverlauf von Patient 1 sowie mit der Virulenz- und Persistenzstudie sequentieller Isolate an Mausmodellen von Bragonzi et al. (2009), die eine hohe Persistenz für Pat1A sowie ferner eine akute und hohe Mortalität für Pat2A zeigte.

Dieses metabolische Profil der Frühisolate auf Glucose-Methionin entspricht dem auf CasAA.

So könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass Frühisolate, die den ersten positiven Befund einer CF-Lunge mit *P. aeruginosa* darstellen, eine Patienten- sowie Medienunabhängigkeit reflektieren bzw. eine Wirts- sowie Medien-unspezifische Adaptation zeigen, die mit ihrer Herkunft als Umweltisolate und dadurch bedingt mit einer effizienten Anpassung an unterschiedliche Nahrungsquellen korreliert.

Vergleich Isolat Pat2B mit Pat1B bei Wachstum auf Glucose-Methionin

Die Charakterisierung der mittleren Isolate beider Patienten unter Verwendung von Glucose-Methionin wird in Abbildung 87 (Tab. 91; S. 267-268) mit Hilfe eines T-Tests visualisiert und erklärt.

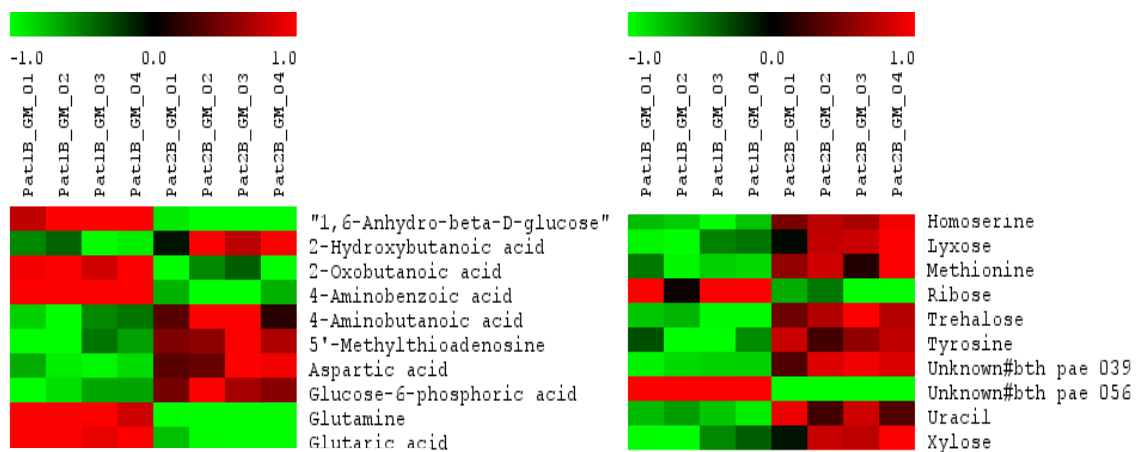


Abb. 105. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B, verglichen mit Pat1B auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Ein hoher Grad an Analogie offenbart die Analyse der mittleren Isolate Pat2B und Pat1B, verifiziert mit einer Korrelation von 0.956. Signifikante Varianzen werden lediglich in dem AHL-Metabolismus, vereinzelt Aminosäuren, der Folat-Biosynthese sowie den Zuckern

und -Phosphaten detektiert. Die Verminderung von 4-Aminobenzoat, Intermediat der Folat-Biosynthese könnte in Relation mit der reduzierten spezifischen Wachstumsrate (Tab. 36) von Pat2B stehen. Folat dient einer schnellen Zellteilung und folglich einem beständigen Fortschreiten des Wachstums.

Außerdem werden Aminosäuren und der AHL-Metabolismus in Pat2B in erhöhten Konzentrationen detektiert. Letzteres lässt Rückschlüsse auf eine gesteigerte Virulenz und die damit verbundene Schwere des Krankheitsverlaufes von Patient 2 ziehen. Weiterhin könnte die Akkumulation der Aminosäuren auf einen effizienten Import in die Zelle hinweisen. Das könnte folglich mit einer erhöhten Adaptation einhergehen, da das in dem Respirationstrakt vorherrschende Milieu einen hohen Grad an Aminosäuren offeriert.

Die Analyse der Korrelationen sowie der metabolischen Profile der mittleren Isolate beider Kultivierungsbedingungen reflektieren einen konträren Charakter.

Unter Verwendung von CasAA als undefiniertes Medium weisen die mittleren Isolate von Patient 1 und 2 eine Korrelation von 0.742 auf und separieren sich sowohl in der PCA (Abb. 91) als auch in der HCA (Abb. 92). Bei Wachstum auf Glucose-Methionin als definiertes Medium hingegen wird für den Vergleich der mittleren Isolate von Patient 1 und 2 eine hohe Korrelation von 0.956 erzielt, und sowohl in der PCA (Abb. 102) als auch in der HCA (Abb. 103) bilden beide ein gemeinsames Cluster.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die mittleren Isolate auf dem nativen Medium ihre, über einen längeren Zeitraum, erworbenen Fähigkeiten effektiver umsetzen können und konsequenterweise in einem Minimalmedium höhere metabolische Analogien aufzeigen, was eine Wirts-spezifische, jedoch Medium-unspezifische Adaptation andeutet.

Vergleich Isolat Pat2C mit Pat1C bei Wachstum auf Glucose-Methionin

Die Charakterisierung der Spätisolate beider Patienten unter Verwendung des Glucose-Methionin-Mediums wird in Abbildung 88 (Tab. 92; S. 269) mit Hilfe eines T-Tests gezeigt und beschrieben.

Signifikante Änderungen im metabolischen Profil lassen sich bei den Spätisolaten Pat2C und Pat1C bei exponentiellem Wachstum auf dem Glucose-Methionin-Medium verzeichnen, verifiziert anhand einer Korrelation von 0.81. In dem Isolat Pat2C liegen Metabolite des Zitronensäurezyklus sowie des β -Alanin-Metabolismus in reduzierten und Metabolite des AHL-Metabolismus in verstärkten Konzentrationen vor. Aminosäuren sowie Zucker und -Phosphate akkumulieren zu gleichen Teilen in beiden Spätisolaten.

Unbekannte Komponenten weisen deutliche Varianzen in beiden Profilen auf und könnten in Relation mit einer medienspezifischen Anpassungsfähigkeit der Isolate stehen, da Unknown#bth_pae_017 sowie Unknown#bth_pae_039 in dem Isolat Pat2C, verglichen mit Pat1C, auf beiden Medien ein antiparalleles Verhalten aufzeigen. Erneut kann die Akkumulation des AHL-Metabolismus in Konsens mit der erhöhten Virulenz infolge des schweren Krankheitsverlaufes von Patient 2 gestellt werden.

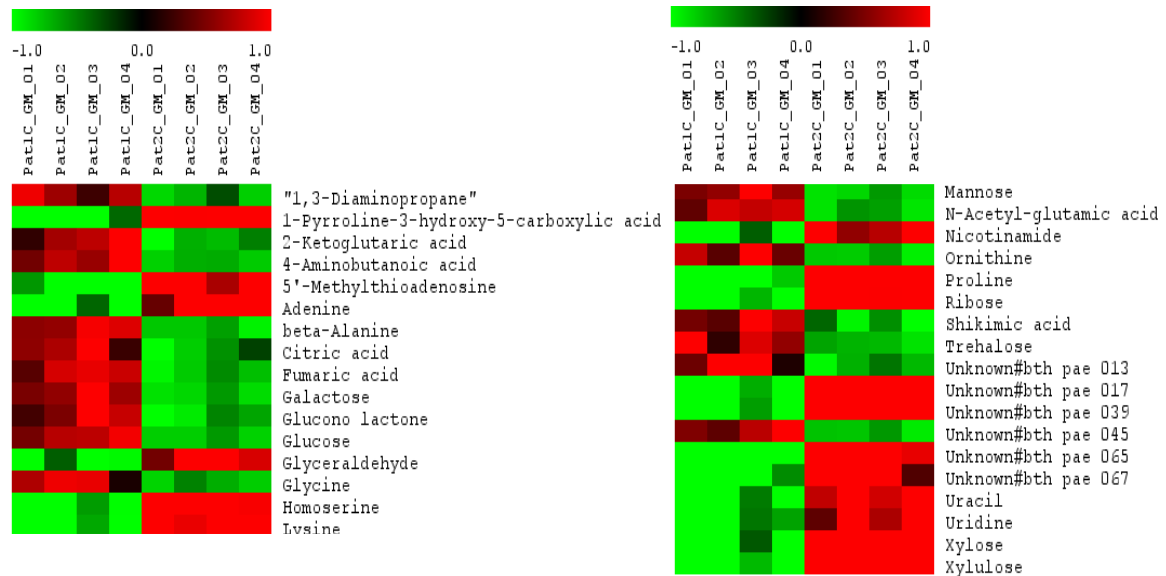


Abb. 106. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C, verglichen mit Pat2C auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Auffallend ist, dass bei Wachstum auf Glucose-Methionin keine Differenz im Methionin-pool detektiert wurde, das auf einen Ausgleich der *lasR*-Mutation von Pat1C durch den Zusatz von Methionin im Medium hindeutet.

Die Charakterisierung der metabolischen Profile der Spätisolate sowohl auf CasAA und auf Glucose-Methionin reflektieren einen entgegengesetzten Charakter. Unter Verwendung von CasAA als undefiniertes Medium clustern die Spätisolate von Patient 1 und 2 sowohl in der PCA (Abb. 91) als auch in der HCA (Abb. 92) getrennt voneinander.

Bei Wachstum auf Glucose-Methionin als definiertes Medium bilden beide in der PCA (Abb. 102) und in der HCA (Abb. 103) ein gemeinsames Cluster, was durch die Annäherung der beiden Spätisolate, auf eine *lasR*-Mutation in Pat2C hinweist, die ebenfalls mit einer Methionin-Auxotrophie korrelieren könnte. Zudem ist das antiparallele Verhalten des Zitronensäurezyklus innerhalb der Spätisolate sowie Medien auffällig, das eine Veränderung im Metabolismus der Isolate andeutet. Das Gesamtbild ist möglicherweise mit einer Wirts-unspezifischen, jedoch Medien-spezifischen Adaptation gleichzusetzen.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 die Wachstums- und Kultivierungsbedingungen für Quinat als alleinige Kohlenstoffquelle in einem Fermenter etabliert werden. Diesem Fermentationsansatz wurden Proben entnommen, aufgearbeitet, derivatisiert und mittels Gaschromatographie-Quadrupol-Massenspektrometrie analysiert. Die aus der Quinat-Fermentation resultierenden semiquantitativen, intrazellulären Metabolitkonzentrationen konnten in definierte Cluster eingeteilt werden, woraus sich die einzelnen Wachstumsphasen ableiten ließen. Infolgedessen konnten die Proben der stationären Wachstumsphasen denen der exponentiellen gegenübergestellt und detaillierter charakterisiert werden.

Anhand der Datenmatrix der Metabolomanalyse kann Quinat über zwei Wege katabolisiert werden. Einerseits kann Quinat via β -Ketoacidweg, andererseits via Aromaten-Generierung metabolisiert werden. Beide Abbauwege enden im Zitronensäurezyklus und stellen die Energie-liefernden Prozesse der Zelle bei Wachstum auf Quinat dar. Untermuert wird diese Vermutung durch die verstärkt akkumulierten Komponenten des Zitronensäurezyklus sowie des Glyoxylat-Wegs (beispielsweise cis-Aconitat, Isocitrat, Glyoxylat, Succinat, Fumarat) und ferner der Gluconeogenese (beispielsweise Phosphoenolpyruvat, 2-Phosphoglycerat, 3-Phosphoglycerat) in der exponentiellen Wachstumsphase der Quinat-Fermentation.

Zudem konnte die bislang noch nicht dokumentierte Fähigkeit von *C. glutamicum* ATCC 13032, den Glyoxylat-Weg unter Verwendung von Quinat als alleinige Kohlenstoffquelle zu aktivieren, gezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurden die Komponenten cis-Aconitat, Isocitrat und Glyoxylat mittels der etablierten GC-Q-MS-Methode detektiert. Ferner wurde eine Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck durchgeführt. Dem Fermenter wurden Proben für die anschließende GC-Q-MS-Analyse entnommen. Die metabolischen Profile der Sauerstoff-limitierten Zellen zeigten eine signifikante Verminderung des Zentralstoffwechsels, wie der Intermediate des Zitronensäurezyklus sowie der Glycolyse bzw. Gluconeogenese, die mit der ausschließlich aeroben Lebensweise von *C. glutamicum* korreliert und mit einer stagnierten Biomasseproduktion der Zellen einhergeht.

Eine rötlich-violette Verfärbung, die in einer Quinat-Kultivierung im Schikanekolben im exponentiellen Wachstum sowie in einem Sauerstoff-limitierten Fermentationsprozess hervorgerufen wurde, konnte nicht näher determiniert werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass es sich um einen Eisen-Komplex handelt, der mit einer Sauerstoffabhängigkeit in Wechselwirkung stehen könnte.

Außerdem wurde im Rahmen dieser Dissertation das Metabolom von *Pseudomonas aeruginosa* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen mittels der GC-Q-MS-Methode detaillierter charakterisiert.

Zunächst mussten dafür die Wachstumsbedingungen für die Kultivierung der Referenzstämme PAO1, TBCF10839 sowie PA14 auf bis zu sieben verschiedenen Medien (Trypton, Caseinaminosäuren, Glucose, Glucose-Methionin, Succinat, Citrat, Cadaverin) angepasst werden, bevor die metabolischen Profile aufgenommen werden konnten. Dabei wurde ein antiparalleles Verhalten des Stoffwechselwegs der aromatischen Aminosäure und der Quinolon/Quinolin-Biosynthese aufgezeigt. Außerdem konnte eine hohe Korrelation von Cadaverin mit den Intermediaten des Acyl-Homoserinlacton-Metabolismus nachgewiesen werden, so dass Cadaverin einen Indikator für die Virulenz darstellen könnte.

Fünf Transposonmutanten (D8A6, PA1436, PA1572, PA5349, PA4640) wurden auf fünf Kohlenstoffquellen (Trypton, Glucose, Succinat, Citrat, Cadaverin) inkubiert und Proben aus dem exponentiellen sowie stationären Wachstum für die GC-Q-MS-Analyse generiert. Dabei wurde speziell die Transposonmutante PA5349 charakterisiert und dem Referenzstamm TBCF10839 gegenübergestellt. Mit Hilfe der Metabolomdaten der Transposonmutante PA5349 wurde nachgewiesen, dass ein Defekt in der Umsetzung von Alkanen zu Fettsäuren vorliegt. Die Charakterisierung des Transkriptoms der Transposonmutante PA5349, die aufgrund der Mutation zudem ein Defizit im *Quorum-Sensing*-System aufwies, zeigte, im Vergleich zum TBCF10839 unter Verwendung der Kohlenstoffquelle Succinat, die Induktion der Gene des *Pseudomonas*-Quinolonsignal-Systems, was auf eine metabolische Komplementation in der Transposonmutante PA5349 hinweist.

Bei Wachstum auf Cadaverin konnte mittels der Metabolom- und Transkriptomdaten der Transposonmutante PA5349, verglichen mit TBCF10839, beobachtet werden, dass einerseits die Metabolite sowie die Gene des Acyl-Homoserinlacton-Metabolismus verstärkt induziert vorliegen. Zudem ergab die Transkriptomanalyse der Transposonmutante PA5349, im Bezug auf den TBCF10839, eine signifikante Reduktion der Expression von Genen, die für Chaperone kodieren.

Im anschließenden Teil wurde eine für *P. aeruginosa* bislang noch nicht dokumentierten Extraktionsmethode für die Phasenseparation hydrophober Metabolite etabliert und an dem Referenzstamm TBCF10839 sowie der Transposonmutante PA5349 angewendet.

Mit Hilfe dieser Methode konnten zwei (cis-9,10-Methylenhexadecanoat, cis-9,10-Methylenoctadecanoat) der drei dominierenden Cyclopropane in bakteriellen Membranlipiden in beiden *P. aeruginosa*-Stämmen in signifikanten Konzentrationen sowohl in der exponentiellen als auch stationären Wachstumsphase detektiert werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolaten von zwei klinischen Cystische Fibrose-Patienten anhand von zwei verschiedenen Kultivierungsbedingungen (Caseinaminosäuren, Glucose-Methionin) untersucht, um daraufhin die intrazellulären Metabolitkonzentrationen dieser CF-Isolate zu analysieren. Mit Hilfe der Analysen intrazellulärer Metabolitkonzentrationen konnte ein Überblick über die Entwicklung und Adaptationsprozesse der sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolate an die relevanten Patienten gewonnen werden. Dabei konnte in den Frühisolaten von beiden Patienten unter Verwendung der zwei Medien, eine signifikante Akkumulation der Intermediate des Fettsäure-Metabolismus detektiert werden, das die erste Adaptation an das Lungenmedium aufgrund der Generierung von Lipid A reflektiert. Weiterhin konnte in den *P. aeruginosa*-Isolaten von Patient 1 ermittelt werden, dass signifikant erhöhte intrazelluläre Polyamin-Konzentrationen mit einer gesteigerten Generationszeit korreliert. Ferner konnte belegt werden, dass die Länge der Persistenz in einem Cystische Fibrose-Patienten mit dem Verlust der Fähigkeit, ohne Aminosäuren wachsen zu können, einhergehen kann. Zusätzlich konnte erwiesen werden, dass bei den Isolaten (Frühisolate), die den ersten positiven *P. aeruginosa*-Befund darstellten, eine Patientenunabhängigkeit vorliegt, das heißt, dass sich diese Isolate analog zueinander verhalten, obwohl sie aus zwei verschiedenen Patienten stammten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mittels der Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Analyse intrazellulärer Metabolitkonzentrationen detaillierte Einblicke in den Stoffwechsel von *C. glutamicum* und *P. aeruginosa* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ermöglicht werden konnte: einerseits qualitativ im Hinblick auf die Metabolitausstattung eines Organismus unter gegebenen Umweltbedingungen und andererseits quantitativ bei der Analyse von Anpassungsprozessen des Metabolismus auf verschiedene äußere Bedingungen.

Die präsentierte Arbeit verdeutlicht die Tragweite von Metabolomstudien an den Modellorganismen *Corynebacterium glutamicum* und *Pseudomonas aeruginosa*.

5 Ausblick

Ergänzend sollten für *C. glutamicum* ATCC 13032 noch Experimente zu der rötlich-violetten Verfärbung, die in der Quinat-Kultivierung im Schikanekolben im exponentiellen Wachstum sowie in einem Sauerstoff-limitierten Fermentationsprozess hervorgerufen wurde, durchgeführt werden, um den postulierten Eisen-Komplex zu verifizieren.

Zusätzlich könnten Transkriptom- sowie Proteomanalysen von auf Quinat gewachsenen *C. glutamicum*-Kulturen und ferner ¹³C-markiertes Quinat unterstützend eingesetzt werden, um die Verstoffwechslung von Quinat nachvollziehen zu können.

Für *P. aeruginosa* wären Virulenzstudien an beispielsweise *Mus musculus* oder *Caenorhabditis elegans* von großer Bedeutung, um nachzuweisen, ob ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Akkumulation von Cadaverin und einer erhöhten Virulenz besteht.

Der Einsatz von Transkriptomanalysen für das exponentielle Wachstum der Transposonmutanten auf den analysierten Kohlenstoffquellen wäre für das Verständnis der metabolischen Komplementation sehr hilfreich.

Für die sequentiellen *P. aeruginosa*-Isolate von klinischen Patienten mit Cystischer Fibrose bietet es sich an, Transkriptomstudien für die in der Arbeit beschriebenen Kultivierungsbedingungen durchzuführen, um die hier präsentierten Metabolomdaten zu komplementieren. Zusätzlich könnten noch weitere sequentielle *P. aeruginosa*-Isolate von verschiedenen klinischen Patienten mit Cystischer Fibrose analysiert werden, um anhand von sich wiederholenden Mustern auf Metabolom- oder Transkriptomebene Rückschlüsse auf beispielsweise Adaptationsprozesse der Isolate ziehen zu können.

Abschließend könnte eine Kombination von „omics“-Techniken mit der Bioinformatik zu einem Gesamtbild eines Modellorganismus führen, was ein tiefer gehendes Verständnis von biologischen Systemen und regulatorischen Mechanismen ermöglicht.

6 Referenzen

- Abe S, Takayama K, Kinoshita S (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
- Adachi O, Tanasupawat S, Yoshihara N, Toyama H, Matsushita K (2003).** 3-Dehydroquinate production by oxidative fermentation and further conversion of 3-Dehydroquinate to the intermediates in the shikimate pathway. *Biosci Biotechnol Biochem.* **67**: 2124-2131.
- Adair FW, Geftic SG, Gelzer J (1969).** Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. I. Growth in benzalkonium chloride solution. *Appl Microbiol* **18**: 299-302.
- Adhikari P, Kirby SD, Nowalk AJ, Veraldi KL, Schryvers AB, Mietzner TA (1995).** Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *J. Bacteriol Chem.* **270**: 25142-25149.
- Apostol I, Levine J, Lippincott J, Leach J, Hess E, Glascock CB, Weickert MJ, Blackmore R (1997).** Incorporation of norvaline at leucine positions in recombinant human hemoglobin expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **272**: 28980-28988.
- Baron S (1996).** Medical Microbiology. [Buchverfassung] Samuel Baron. 4th Edition: 27.
- Barth AL, Pitt TL (1996).** The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **45**: 110-119.
- Bathe B, Kalinowski J, Pühler A (1996).** A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 255-265.
- Baumbach J, Wittkop T, Kleindt CK, Tauch A (2009).** Integrated analysis and reconstruction of microbial transcriptional gene regulatory network using CoryneRegNet. *Nature Protocols* **4**: 992-1005.
- Bayan N, Houssin C, Chami M, Leblon G (2003).** Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J. Biotechnol.* **104**: 55-67.
- Berger M (2002).** Inflammatory mediators in cystic fibrosis lung disease. *Allergy Asthma Proc.* **23**: 19-25.
- Bernard CS, Bordi C, Termine E, Filloux A, de Bentzmann S (2009).** Organization and Ppr-dependent control of the *Pseudomonas aeruginosa* *tad* locus involved in Flp pilus biology. *J Bacteriol.* doi:10.1128/JB.01330-08.
- Blau K, King GS (1977).** *Handbook of derivatives for chromatography.* Heyden.
- Bogosian G, Violand BN, Dorward-King EJ, Workman WE, Jung PE, Kane JF (1989).** Biosynthesis and incorporation into protein of norleucine by *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **264**: 531-539.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003).** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* **19**:185-193.
- Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS (2004).** Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2659-2664.
- Börner J, Buchinger S, Schomburg D (2007).** A high-throuput method for microbial metabolome analysis using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **367**: 143-151.
- Bragonzi A, Wiehlmann L, Klockgether J, Cramer N, Worlitzsch D, Döring G, Tümmler B (2006).** Sequence diversity of the mucABC locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiol.* **152**: 3261-3269.
- Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J, Di Serio C, Döring G, Tümmler B (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *AJRCCM* **180**: 138-145.
- Braveny I, Krump- Schmidt W (1985).** *Pseudomonas aeruginosa*; W. Zuckschwerdt Verlag, München.
- Bredenbruch F, Geffers R, Nimtz M, Buer J, Häussler S. 2006.** The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ Microbiol* **8**: 1318-1329.

- Breitenstein S, Walter S, Bosshammer J, Römmling U, Tümmler B (1997). Direct sputum analysis of *Pseudomonas aeruginosa* macrorestriction fragment genotypes in patients with cystic fibrosis. *Med. Microbiol. Immunol.* **186**: 93-99.
- Brinkrolf K, Brune I, Tauch A (2006). Transcriptional regulation of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Genetics Molecular Research* **5**: 773-789.
- Brint JM, Ohnam DE (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* **177**: 7155-7163.
- Buchholz A, Hurllebaus J, Wandrey C, Takors R (2002). Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol Eng.* **19**: 5-15.
- Burkovski (2003). Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 617-628.
- Buziol S, Bashir I, Baumeister A, Claaßen W, Noisommit-Rizzi N, Mailinger W, Reuss M (2002). New bioreactor-coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale. *Biotechnol. Bioengineering* **80**: 632-636.
- Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, Kaipa P, Krummenacker M, Latendresse M, Paley S, Rhee SY, Shearer A, Tissier C, Walk TC, Zhang P, Karp PD (2008). The MetaCyc Database of metabolic pathway and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Res.* Online publication.
- Castrillo JI, Hayes A, Mohammed S, Gaskell SJ, Oliver SG (2003). An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* **62**: 929-937.
- Chang YY, Cronan JE (1999). Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**: 249-259.
- Chassagnole C, Diano A, Létisse F, Lindley ND (2003). Metabolic network analysis during fed-batch cultivation of *Corynebacterium glutamicum* for pantothenic acid production: first quantitative data analysis of by-product formation. *J. Biotechnol.* **104**: 261-272.
- Chattopadhywa MK, Tabor CW, Tabor H (2003). Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2261-2265.
- Choi C, Münch R, Leupold S, Klein J, Siegel I, Thielen B, Benkert B, Kucklick M, Schobert M, Barthelmes J, Ebeling C, Haddad I, Scheer M, Grote A, Hiller K, Bunk B, Schreiber K, Retter I, Schomburg D, Jahn D (2007). SYSTOMONAS – an integrated database for systems biology analysis of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Res* **35** (Database issue): 533-537.
- Choorapoikayil S (2006). Metabolomanalyse von Shikimatehydrogenase knock out Mutanten aus *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit. Universität zu Köln.
- Clifford DP und Repine JE (1982). Hydrogen peroxide mediated killing of bacteria. *Mol. Cell. Biochem.* **49**: 143-149.
- Coleman J., Hudson LL, McKnight SL, Farrow III JM, Worth Calfee M, Lindsey CA, Pesci EC (2008). *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-Coenzyme A Ligase. *J. Bact.* **190**: 1247-1255.
- Cowie DB, Cohen GN, Bolton ET, De Robichon-Szulmajster H (1959). Amino acid analog incorporation into bacterial proteins. *Biochim Biophys Acta* **34**: 39-46.
- Cox CD (1982). Effect of pyochelin on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **36**: 17-23.
- Cox CD (1986). Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect Immun* **52**: 263-270.
- Cramer A (2006). RamA und RamB sind zentrale Transkriptions-Regulatoren für den Kohlenstoff-Metabolismus von *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Fakultät für Naturwissenschaften, Universität Ulm.
- Cramer N (2009). Microevolution von *Pseudomonas aeruginosa* in Patienten mit cystischer Fibrose. Doktorarbeit an der Medizinische Hochschule Hannover.
- Crowfoot PD, Hunt AL (1971). Induced synthesis of cyclopropane fatty acid synthetase in *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta.* **218**: 555-557.
- Crueger A (1989). Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. 3. Auflage,

- Oldenburg.
- Cunin R, Glansdorff N, Pierard A, Stalon V (1986).** Arginin biosynthesis and metabolism in bacteria. *Microbiological Reviews* **50**: 314-352.
- Cystic Fibrosis Foundation (1995).** Patient Registry Annual Data Report, Bethesda, Maryland, August 1996.
- Daffe M (2005).** The cell envelope of corynebacteria. In *Handbook of Corynebacterium glutamicum* 121-148. Edited by L. Eggeling & M. Bott. Boca Raton: CRC Press.
- Dauner M, Sauer U (2000).** GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol Prog.* **16**: 642-649.
- Dela Vega AL, Delcour AH (1996).** Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* **178**: 3715-3721.
- De Ley J (1960).** Comparative carbohydrate metabolism and localisation of enzymes in *Pseudomonas* and related microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 400-441.
- Deziel E, Lepine F, Milot S, Villemur R (2003).** rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxy-alkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.* **149**: 2005-2013.
- Diab F, Bernard T, Bazire A, Haras D, Blanco C, Jebber M (2006).** Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology* **152**: 1395-1406.
- Diggle SP, Cornelis P, Williams P and Camera M (2006a).** 4-quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int J Med Microbiol* **296**: 83-91.
- Diggle SP, Lumjiaktase P, Dipilato F, Winzer K, Kunakorn M, Barrett DA, Chhabra SR, Camara M, Williams P (2006b).** Functional genetic analysis reveals a 2-alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chem. Biol.* **13**: 701-710.
- Dominguez H, Rollin C, Guyonvarch A, Guerquin-Kern, Coccagn-Bousquet M, Lindley (1998).** Carbon-flux analysis distribution in the central metabolic pathway of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur J Biochem* **254**: 96-102.
- Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE (2005).** Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* **130**: 606-625.
- Dunne WM, Jr., (2002).** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* **15**: 155-166.
- Dunn WB und Ellis DI (2005).** Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC* **24**: 285-294.
- Eggeling L, Oberle S, Sahm H (1998).** Improved L-Lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of dapA resulting in increased flux combined with growth limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 24-30.
- Eggeling L und Sahm H (2001).** The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 201.
- Eggeling L, Bott M (2005).** *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press Taylor and Francis Group.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998).** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14863-14868.
<http://www.tm4.org/mev.html>
- Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan J (1998).** Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* **273**: 16792-16797.
- Entner N, Doudoroff M (1952).** Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J. Biol. Chem.* **196**: 853-862.
- Ernst RK, Yi EC, Guo L, Kheng BL, Burns JL, Hackett M, Miller SI (1999).** Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science.* **286**: 1561-1565.
- Ernst RK, Adams KN, Moskowitz SM, Kraig GM, Kawasaki K, Stead CM, Trent MS, Miller SI (2006).** The *Pseudomonas aeruginosa* Lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *J Bacteriol.* **188**: 191-201.

- Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer K, Jahn J, Schobert M (2004). Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol* **186**: 4596-4604.
- Fareleira P, Santos BS, António C, Moradas-Ferreira P, LeGall J, Xavier AV, Santos H (2003). Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas*. *Microbiol* **149**: 1513-1522.
- Favero MS, Carson LA, Bond WW, Peterson NJ (1971). *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* **173**: 836-838.
- Fiehn O, (2002). Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* **48**: 155-171.
- Fiehn O, (2003). Metabolic networks of *Cucurbita maxima* phloem. *Phytochemistry* **62**: 875-886.
- Fothergill JC, Guest JR (1977). Catabolism of L-Lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J General Microbiol* **99**: 139-155.
- Förster-Fromme K, Höschle B, Mack C, Bott M, Armbruster W, Jendrosseck D (2006). Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/Isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4819-4828.
- Förster-Fromme K, Jendrosseck D (2008). Biochemical characterization of isovaleryl-CoA dehydrogenase (LiuA) of *Pseudomonas aeruginosa* and the importance of *liu* genes for a functional catabolic pathway of methyl-branched compounds. *FEMS Microbiol letters*. **286**: 78-84.
- Fredlund E, Broberg A, Boysen ME, Kenne L, Scürer J (2003). Metabolite profiles of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121 grown under oxygen limitation. *Appl Microbiol Biotechnol*. **64**: 403-409.
- Frazao C, Silva G, Gomes CM, Maties P, Coelho R, Sieker L, Macedo S, Liu MY, Oliveira S, Teixeira M, Xavier AV, Rodrigues-Pousada C, Coondo MA, Le Gall J (2000). Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas*. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1041-1045.
- Frimmersdorf E (2005). Metabolomanalyse von *Corynebacterium glutamicum* nach Kultivierung auf verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen. Diplomarbeit. Universität zu Köln.
- Fuchs G, Eitinger T, Schlegel HG (2007). Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-response transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**: 269-275.
- Gambello MJ, Iglewski BH (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol.* **173**: 3000-3009.
- Garcia DE, Baidoo EE, Benke PI, Pingitore F, Tang YJ, Villa S, Keasling JD (2008). Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics. *Curr Opin Microbiol.* **11**: 233-239.
- Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E, Wilson ID, Nicholson JK (2000). An NMR-based metabolomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk:ApfCD mouse. *FEBS Lett.* **484**:169-174.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rosssini AJ, Sawitzki, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**:R80.
- Gerstmeir R, Wendisch VF, Schnicke S, Ruan H, Farwick M, Reinscheid D, Eikmanns BJ (2003). Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**: 99-122.
- Gibson KJC, Eggeling L, Maughan WN, Krumbach K, Gurcha SS, Nigou J, Puzo G, Sahm H, Besra GS (2003). Disruption of Cg-Ppm1, a polyprenyl monophosphomannose synthase, and the generation of lipoglycan less mutants in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **278**: 40842-40850.
- Govan JR und Deretic V (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**: 539-574.
- Grasemann H, Ioannidis I, Tomkiewicz RP, de Groot H, Rubin BK, Ratjen F (1998). Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch Dis Child* **78**: 49-53.
- Griffin JL, Bollard M, Nicholson JK, Bhakoo K (2002). Spectral profiles of cultured neuronal and

- glial cells derived from HRMAS H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* **15**: 375-384.
- Griffin JL (2006).** Understanding mouse models of disease through metabolomics. *Chem. Biol.* **10**: 309-315.
- Grogan DW, Cronan Jr. JE (1997).** Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol.* **61**: 429-441.
- Grouzmann E, Cavadas C, Grand D, Moratel M, Aubert JF, Brunner HR, Mazzolai L (2003).** Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. *Pfluegers Arch.* **447**: 254-258.
- Haas D, Galimand M, Gamper M, Zimmermann A (1990).** Arginine network of *Pseudomonas aeruginosa*: specific and global controls. In *Pseudomonas*, Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology. Silver S, Chakrabarty AM, Iglewski B and Kaplan S (eds.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press: 303-316.
- Haddad I, Hiller K, Frimmersdorf E, Benkert B, Schomburg D, Jahn D (2009).** An emergent self-organizing map based analysis pipeline for comparative metabolome studies. *In Silico Biology* **9**: 163-178. <http://esomet.tu-bs.de/>
- Hagelueken G, Wiehlmann L, Adams TM, Kolmar H, Heinz DW, Tümmler B, Schubert WD (2007).** Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin-rebaredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **104**: 12276-12281.
- Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI (2002).** Human toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol.* **3**: 354-359.
- Hassett DJ, Sokol PA, Howell ML, Ma JF, Schweizer HT, Ochsner U, Vasil ML (1996).** Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol* **178**: 3996-4003.
- Hardalo C, Edberg SC (1997).** *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiol.* **23**: 47-75.
- Häussler S, Tümmler B, Weißbrodt H, Rohde M, Steinmetz I (1999).** Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clinical Infect. Diseases* **29**: 621-625.
- He J, Baldini RL, Deziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM, Rahme LG (2004)** Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 2530-2535.
- Heller M (2002).** Aufbau funktionaler Polymerarchitekturen mit supramolekularen Einheiten. Herbert Utz Verlag GmbH.
- Heulier K, Denervaud V, Haas D (2006).** Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 93-102.
- Hickey WJ, Focht DD (1990).** Degradation of mono-, di-, and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2. *Appl Environ Microbiol* **56**: 3842-3850.
- Hiller K, Hangebrauk J, Jäger C, Spura J, Schreiber K, Schomburg D (2009).** MetaboliteDetector: Comprehensive analysis tool for targeted and nontargeted GC/MS based metabolome analysis. *Anal. Chem.* **81**: 3429-3439.
- Holloway BW (1955).** Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **13**: 572-581.
- Hollsing AE, Granström M, Vasil ML, Wretling B, Strandvik B (1987).** Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1868-1874.
- Hornef MW, Roggenkamp A, Geiger AM, Hogardt M, Jacobi CA, Heesemann J (2000).** Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (exo) S, ExoT und ExoU synthesis. *Microb Pathog* **29**: 329-343.
- Höschle B, Gnau V, Jendrosseck D (2005).** Methylcrotonyl-CoA carboxylase and geranyl-CoA carboxylase are involved in leucine/isovalerate utilisation (Liu) and in acyclic terpenes utilisation (Atu) and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **151**: 3649-3656.
- Hotelling H (1930).** The consistency and ultimate distribution of optimum statistics. In *Transactions of the American Mathematical Society.* **32**: 847-859.
- Howe TR, Iglewski BH (1984).** Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun* **43**: 1058-1063.

- Hübschmann H (2001). Handbuch der GC/MS: Grundlagen und Anwendung. Weinheim: VCH.
- Ikeda M, Nakagawa S (2003). The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 99-109.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* **31**:e15.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* **4**:249-264.
- Ishige T, Krause M, Bott M, Wendisch VF, Sahm H (2003). The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *J Bacteriol.* **185**: 4519-4529.
- Itoh Y (1997). Cloning and characterization of the *aru* genes encoding enzymes of the catabolic arginine succinyltransferase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **179**: 7280-7290.
- Jeong H, Tombor B, Albert R, Oltvai ZN, Barabasi AL (2000). The large-scale organization of metabolic models. *Nature* **407** **6804**: 651-654.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuik Y, McGinnis S, Madden TL (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucl Acids Res.* **36**: suppl_2 W5-W9.
- Jones OAH, Cheung VL (2007). An introduction to metabolomics and its potential application in veterinary science. *American Association Laboratory Animal Science* **57**: 436-442.
- Jung IL, Oh TJ, Kim IG (2003). Abnormal growth of polyamine-deficient *Escherichia coli* mutant is partially caused by oxidative stress induced damage. *Arch. Biochem. Biophys.* **418**: 125-132.
- Junker BH, Klukas C, Schreiber F (2006). VANTED: a system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC Bioinformatics* **7**: 109.
- Kaderbhai NN, Broadhurst DI, Ellis DI, Goodacre R, Kell DB (2003). Functional genomics via metabolic secretion by *Escherichia coli* tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry. *Comp. Funct. Genomics* **4**: 376-391.
- Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmann BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Krämer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Möcker B, Pfeifferle W, Pühler A, Rey DA, Rückert C, Rupp O, Sahm H, Wendisch VF, Wiegräbe I, Tauch A (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Bacteriol* **104**: 5-25.
- Karp PD, Ouzounis CA, Moore-Kochlacs L, Holdovsky L, Kaipa P, Ahren D, Tsoka S, Darzentas N, Kunin V, Lopez-Bigas N (2005). Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6083-6089.
- Karp PD, Riley M, Sailer M, Paulsen IT, Paley S, Pellegrini-Toole A (2000). The EcoCyc and MetaCyc Databases. *Nucleic Acids Res.* **28**:56-59.
- Kather B, Stingl K, van der rest ME, Altendorf K, Molenaar D (2000). Another unusual type of citric acid cycle enzyme in *Helicobacter pylori*: the malate:quinone oxidoreductase. *J Bacteriol* **82**: 3204-3209.
- Kell DB (2004). Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol* **7**: 296-307.
- Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J Biol Chem* **268**:7503-7508.
- Kiefer P, Heinzle E, Zelder O, Wittmann C (2004). Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl Environ Microbiol* **70**: 229-239.
- Kiewitz C, Tümmler B (2000). Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol* **182**: 3125-35.
- Kim IG, Oh TJ (2000). SOS induction of the *recA* gene by UV-, gamma-irradiation and mitomycin C is mediated by polyamines in *Escherichia coli* K-12. *Toxicol. Lett.* **116**: 143-149.
- Kinoshita S (2005). A short history of the birth of the amino acid industry in Japan, in Handbook of *Corynebacterium glutamicum*, L. Eggeling and M. Bott, Editors. 2005, Taylor & Francis Groups. 3-5.
- Kiratisin P, Tucker KD and Passador L (2002). LasR, a transcriptional activator of

- Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *J. Bacteriol.* **184**: 4912-4919.
- Kocan M, Schaffer S, Ishige T, Sorger-Herrmann U, Wendisch VF, Bott M (2006). Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol.* **188**: 724-732.
- Koch C, Høiby N (1993). Pathogenesis of cystic fibrosis. *The Lancet* **341**: 1065-1069.
- Koide Y, Honma M, Shimomura (1977a). L-alanine- α -keto acid aminotransferase of *Pseudomonas* sp. *Agric Biol Chem.* **41**: 781-784.
- Koide Y, Honma M, Shimomura (1977b). Branched chain aminotransferase from *Pseudomonas* sp. *Agric Biol Chem.* **41**: 1171-1177.
- Koide Y, Honma M, Shimomura T (1980). L-tryptophan- α -ketoisocaproate aminotransferase from *Pseudomonas* sp.. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2013-2019.
- Kopka J, Fernie A, Weckwerth W, Gibson Y, Stitt M (2004). Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biology* **5**: 109.
- Kornberg HL, Gotto AM, Lund P (1958). Effect of growth substrates on isocitratase formation by *Pseudomonas ovalis* Chester. *Nature* **4647**: 1430-1431.
- Kovachevich R, Wood WA (1955 a). Carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens*: III. Purification and properties of a 6-phosphogluconate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **213**: 745-756.
- Kovachevich R, Wood WA (1955 b). Carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens*: IV. Purification and properties of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase. *J. Biol. Chem.* **213**: 757-767.
- Krämer R, Lambert C, Hoischen C, Ebbinghausen H (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur J Biochem* **194**: 925-935.
- Krämer R, Lambert C (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. Evidence for a primary active transport system. *Eur J Biochem* **194**: 937-944.
- Kronmeyer W, Peekhaus N, Krämer R, Eggeling L, Sahm H (1995). Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**: 1152-1158.
- Kretzschmar U, Khodaverdi V, Jeoung J-H, Görisch (2008). Function and transcriptional regulation of the isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol* **190**: 151-158.
- Kretzschmar U, Ruckert A, Jeoung J-H, Görisch H (2002). Malate:quinone oxidoreductase is essential for growth on ethanol or acetate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**: 3839-3847.
- Lahner B, Gong JM, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinot ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L, Schroeder JI, Salt DE (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol* **21**: 1215-1221.
- Lark C (1968). Studies on the in vivo methylation of DNA in *Escherichia coli* 15T. *J Mol Biol* **31**: 401-414.
- Lark C; Arber W (1970). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. 13. Breakdown of cellular DNA upon growth in ethionine of strains with r plus-15, r plus-P1 or r plus-N3 restriction phenotypes. *J Mol Biol* **52**: 337-348.
- Larsson G und Törnkvist M (1996). Rapid sampling, cell inactivation and evaluation of low extracellular glucose concentrations during fed-batch cultivation. *J Biotechnol.* **49**: 69-82.
- Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**: 1137-1146.
- Lee B, Haagensen JAJ, Ciofu O, Andersen Jb, Høiby N, Molin S (2005). Heterogeneity of biofilm formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**: 5247-5255.
- Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme LG, Ausubel FM (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* **7**: R90.

- Lequette Y, Lee J-H, Ledgham F, Lazdunski A, Greenberg EP (2006). A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J Bacteriol* **188**: 3365-3370.
- Lessie TG & Phibbs PV (1984). Alternative pathways of carbohydrate utilization in *Pseudomonads*. *Ann Rev Microbiol* **38**: 359-387.
- Leuchtenberger W (1996). Amino acids, technical production and use. Products of Primary Metabolism (Rehm HJ & Reeds G, eds.). *Biotechnol* **6**: 455-502, VCH Weinheim, Deutschland.
- Liebl W (1991). The genus *Corynebacterium* – nonmedical. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, and Schleifer KH (Eds.). *The Prokaryotes*, Vol. 2. Springer, New York. 1157-1171.
- Lible W (2005). Genomic and applied microbiology. Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen.
- Lilley KS, Razzaq A, Dupree P (2002). Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Curr Opin Chem Biol*. **6**: 46-50.
- ter Linde JJ, Liang H, Davis RW, Steensma HY, van Dijken JP, Pronk JT (1999). Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. **181**: 7409-7413.
- Loret MO, Pedersen L, Francois J (2007). Revised procedures for yeast metabolites extraction: application to a glucose pulse to carbon-limited yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway. *Yeast*. **24**: 47-60.
- Lumppio HL, Shenvi NV, Summers AO, Voordouw G, Kurtz DM (2001). Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: novel oxidative stress protection system. *J Bacteriol*. **183**: 101-108.
- Luzar MA, Montie TC (1985). Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun*. **50**: 572-576.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev* **15**: 194-222.
- Macfarlane EL, Kwasnicka LA, Ochs MM, Hancock RE (1999). Pho-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and Polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol*. **34**: 305-316.
- Macfarlane EL, Kwasnicka LA, Hancock RE (2000). Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* **146**: 2543-2554.
- Mahentiralingam E, Campbell ME, Speert D (1994). Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect and Immunity* **62**: 596-605.
- Mashego MR, van Gulik WM, Vinke JL, Heijnen JJ (2003). Critical evaluation of sampling techniques for residual glucose determination in carbon-limited chemo- stat culture of *Saccharomces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. **83**: 395-399.
- Matthew R et al., (2000). Relationships between community behavior and pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. In Brogden KA et al. (ed.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. 3rd Edn. ASM Press. Washing DC. 77-104.
- McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 2702-2708.
- Measures JC (1975). Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* (London) **257**: 398-400.
- Meyer JM, Meely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA (2006). Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**: 518-523.
- Migula W (1894) Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem Biologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe* 1; 235-238.
- Miller MB, Bassler BL (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-199.
- Miller RM, Tomaras AP, Barker AP, Voelker DR, Chan ED, Vasil AI, Vasil ML (2008). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility-mediated chemotaxis towards phospholipids and fatty acids: specificity and metabolic requirements. *J Bacteriol* **190**: 4038-4049.
- Mima T, Sekiya H, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T (2005). Gene cloning and properties of the RND-Type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from

- Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* **49**: 999-1002.
- Minnikin D, Collins M, Goolfellow M (1978)**. Lidid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. 88-91. In I. J. Bousfield and A. G. Calley (ed.), *Coryneform bacteria*. Academic Press, Inc., New York.
- Minton KW, Tabor H Tabor CW (1990)**. Paraquat toxicity is increased in *Escherichia coli* defective in the synthesis of polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2851-2855.
- Mizuno T und Kageyama M (1978)**. Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem.* **84**: 179-191.
- Molenaar D, van der Rest ME, Petrovic S (1998)**. Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur J Biochem* **254**: 395-403.
- Molenaar D, van der Rest ME, Drysch A, Yucel R (2000)**. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* **182**: 6884-6891.
- Mori M, Shiio I (1987)**. Pyruvate formation and sugar metabolism in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 129-138.
- Moritz B, Striegel K, de Graaf AA, Sahm H (2000)**. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for prediction pentose phosphate pathway flux in vivo. *Eur J Biochem.* **267**: 3442-3452.
- Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI (2004)**. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J. Bacteriol.* **186**: 575-579.
- Munier R, Cohen GN (1956)**. Incorporation of structural analogues of amino acids in bacterial proteins. *Biochim Biophys Acta* **21**: 592-593.
- Munier R, Cohen GN (1959)**. Incorporation of structural analogues of amino acids into bacterial proteins during their synthesis in vivo. *Biochim Biophys Acta* **31**: 378-391.
- Müller-Esterl W (2009)**. Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Spektrum Verlag.
- Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW (1985)**. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* **27**: 619-624.
- Nguyen H (2008)**. The Encephalon. Thoughts and discussion on microbiology and molecular biology. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis.
- Nogales J, Palsson B, Thiele I (2008)**. A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC System Biology.* **2**: 79.
- Nolden L, Beckers G, Möckel B, Pfefferle W, Madhavan Nampoothiri K, Krämer R, Burkovski A (2000)**. Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organization of corresponding genes and investigation of activity. *FEMS Microbiology Letters.* **189**: 305-310.
- Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J (1994)**. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**: 2044-2054.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M (1999)**. KEGG: Kyoto Encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**: 29-34.
- Ohman DE, Burns RP, Iglewski BH (1980)** Corneal infections in mice with toxin A and elastase mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infec Dis.* **142**: 547-555.
- Ohman DE, Chakrabarty AM (1982)**. Utilization of human respiratory secretions by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* of cystic fibrosis origin. *Infec. Immun.* **37**: 662-669.
- Paithankar KS, Feller C, Kuettner EB, Keim A, Grunow M, Sträter N (2007)**. Cosubstrate-induced dynamics of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *FEBS J.* **274**: 5767-5779.
- Palleroni NJ (1984)**. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 141-199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Palleroni NJ (1985)**. Taxonomy of Pseudomonads. In *The Bacteria*, J.R. Sokatch, Editor. Academic Press: London, Großbritannien; Orlando, USA.
- Palleroni NJ (1986)**. Taxonomy of Pseudomonads, 3-25. In: Sokatch JR (ed.): *The Bacteria*, Volume X; *The Biology of Pseudomonas*. Academic Press, Orlando, FL.

- Palmer KL, Mashburn LM, Singh PK, Whiteley M (2005). Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *J Bacteriol.* **187**: 5267-5277.
- Pavlovskis OR, Wretling B (1979). Assessment of protease (Elastase) as a *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor in experimental mouse burn infection. *Infect Immun* **24**: 181-187.
- Pearson K (1901). On lines and planes of closest fit to a system of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* series 6, **2**: 559-572.
- Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J.Bacteriol.* **181**: 1203-1210.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 11229-11234.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH (1997). Regulation of the las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**: 3127-3132.
- Pier GB (1998). *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. *ASM News* **64**: 339-347.
- Pollak J, Perou CM, Alizadeh Ash A, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO (1999). Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature letter* **23**
- Poole K, Dean C, Heinrichs D, Neshat S, Krebs K, Young L, Kilburn (1996). Siderophore-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*, p. 371-383. In T. Nakazawa (ed.), *Molecular biology of Pseudomonas*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Preston MJ, Seed PC, Toder DS, Iglewski BH, Ohman DE, Gustin JK, Goldberg JB, Pier GB (1997). Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun* **65**: 3086-3090.
- Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K, Oliver SG (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat. Biotechnol.* **19**: 45-50
- Rahman SA, Advani P, Schunk R, Schrader R, Schomburg D (2005). Metabolic pathway analysis web service (Pathway Hunter Tool CUBIC). *Bioinformatics* **21**: 1189-1193.
- Rakhimova E (2007). Genetic traits of *P. aeruginosa* morphotypes affecting virulence in vivo. Leibniz Universität Hannover.
- Ramos JL (editor) (2004). *Pseudomonas*. New York: Kluwer Academia/Plenum Publishers:2132 p.
- Raychaudhuri S, Stuart JM, Altman (2000). Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pacific Symposium on Biocomputing 2000*, Honolulu, Hawaii, 452-463.
<http://www.tm4.org/mev.html>
- Reimann C, Patel HM, Serino L, Barone M, Walsh CT, Haas D (2001). Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **183**: 813-820.
- Reinhardt D, Götz M, Kraemer R, Schöni MH (2001). *Cystische Fibrose*. Springer-Verlag.
- Robards K, Haddad PR, Jackson PE (1997). *Principles and practice of modern chromatographic methods*. Academic Press. London.
- Röbber M und Müller V (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ. Microbiol.* **3**: 743-754.
- Roessner U, Wagner C, Kopka J1, Trethewey R, Willmitzer L (2000). Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J.* **23**: 131-142.
- Römling U, Fiedler B, Boßhammer J, Grothues D, Greipel J, von der Hardt H, Tümmler B (1994). Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J. Infect. Diseases* **170**: 1616-1621.
- Ruby EG (1996). Lessons from cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol* **50**: 591- 624.
- Samartzidou HM, Mehrazin Z Xu, Benedikt MJ, Delcour AH (2003). Cadaverine inhibition of

- porin plays a role in cell survival at acidic pH. *J. Bacteriol.* **185**: 13-19.
- Saz HJ, Hillary EP (1956)**. The formation of glyoxylate and succinate from tricarboxylic acids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J.* **62**: 563-569.
- Schauer N & Fernie AR (2006)**. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends Plant Science* **11**: 508-516.
- Schilling CH und Palsson BO (1998)**. The underlying pathway structure of biochemical reaction networks. *Proceedings of the National Academy of Science* **95**, **8**: 4193-4198.
- Schomburg I, Chang A, Schomburg D (2002)**. BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Res* **30**: 47-49.
- Schoepe (2006)**. Enzymkinetische und strukturelle Untersuchungen der drei Shikimat/Quinat-Dehydrogenasen aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation. Köln.
- Schuster M, Greenberg EP (2006)**. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* **296**: 73-81.
- Seed PC, Passador L, Iglewski BH (1995)**. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* **177**: 654-659.
- Shellie RA, Welthagen W, Zrostlikova J, Spranger J, Ristow M, Fiehn O, Zimmermann R (2005)**. Statistical methods for comparing comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry results: metabolomic analysis of mouse tissue extracts. *J Chromatography A* **1086**: 83-90.
- Shen XH, Jiang CY, Huang Y, Liu ZP, et al. (2005a)**. Functional identification of novel genes involved in the glutathione-independent gentisate pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3442-3452.
- Shen XH, Huang Y, Liu SJ (2005b)**. Genomic analysis and identification of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Micobes Environ.* **20**: 160-167.
- Shepherd T, Dobson G, Marshall R, Verral SR, Connor S, Griffiths DW, Stewart D, Davies HV (2004)**. Analysis of metabolites from *Solanum* species using gas chromatography-(time-of-flight) mass spectrometry and automated data analysis. In: Ashcroft AE, Brenton G, Monaghan JJ, eds. *Advances in mass spectrometry*, Vol. **16**, CD Supplement, Abstract 876, Elsevier.
- Shevchenko A, Jensen OL, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M (1996)**. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 14440-14445.
- Silberbach M, Schäfer M, Hüser AT, Kalinowski J, Pühler A, Krämer R, Burkowski A (2005)**. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transkriptome and proteome techniques. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2391-2402.
- Silberbach M, Burkowski A (2006)**. Application of global analysis techniques to *Corynebacterium glutamicum*: new insights into nitrogen regulation. *J Biotechnol* **120**: 101-110.
- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP (2000)**. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**: 762-764.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ (2002)**. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**: 552-555.
- Smith E, Buckley DG, Zainig W, Saenphimmackak C, Hoffman LR, Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV (2006)**. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *PNAS* **103**: 8487-8492.
- Soini J, Falschlehmer C, Liedert C, Bernhardt J, Vuoristo J, Neubauer P (2008)**. Norvaline is accumulated after a down shift of oxygen in *Escherichia coli* W3110. *Microbial Cell Factories* **7**: 30.
- Spura J, Reimer L, Wieloch P, Schreiber K, Buchinger S, Schomburg D (2009)**. A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast. *Anal. Biochem.* In press.
- Soksawatmaekhin W, Kuraishi A, Sakata K, Kashiwagi K, Igarashi K (2004)**. Excetion and uptake od cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **51**: 1401-1412.

- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey (1997).** Proposal for a new hierarchal classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int Syst Bacteriol* **47**: 479-491.
- Stein SE (1999).** An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*. Bd. 10: 770-781.
- Stein SE und Mallard G (2007).** AMDIS. *AMDIS Download Page* [Online]
<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>.
- Storey DG, Ujack EE, Rabin HR, Mitchell I (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* **66**: 2521-2528.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, and Olson MV (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Strelkov S (2004).** Entwicklung und Anwendung einer Methode zur Metabolomanalyse von *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation. Köln.
- Strelkov S, von Elstermann M, Schomburg D (2004).** Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry *Biol. Chem.* **385**: 853-861.
- Suter S (1994).** The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **150**: 118-122.
- Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM (1999).** Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 715-720.
- Teramoto H, Inui M, Yukawa H (2009).** Regulation of expression of genes involved in quinate and shikimate utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3461-3468.
- Thomas SR, Ray A, Hodson ME, Pitt TL (2000).** Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax* **55**: 795-797.
- Thielen B (2007).** Entwicklung und Durchführung von Metabolomanalysen an *Pseudomonas aeruginosa* mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Dissertation, Köln.
- Tkachenko A, Nesterova L, Pshenichov M (2001).** The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **176**: 155-157.
- Tolstikov VV, Fiehn O (2002).** Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. *Anal Biochem.* **301**: 298-307.
- Trent MS (2004).** Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem. Cell Biol.* **82**: 71-86.
- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N (1985).** Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* **230**: 1054-1057.
- Tümmler B. (1987).** Unusual mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Infection* **15**: 311-312.
- Tümmler B, Koopman U, Grothues D, Weissbrodt H, Steinkamp D, von der Hardt H (1991).** Nosocomial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* by cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **29**: 1265-1267.
- Tümmler C und Kiewitz C (1999).** Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Molecular Medicine Today* **5**: 351-358.
- Ueda A, Attila C, Whiteley M, Wood WK (2008).** Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist. *Microbiol Biotechnol.* doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00060.x
- van Beilen JB, Neuenschwander M, Smits THM, Roth C, Balada SB, Witholt B (2002).** Rubredoxins involved in alkane oxidation. *J. Bacteriol.* **184**: 1722-1732.
- van Delden C, Iglewski BH (1998).** Cell-to-cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**: 551-560.

- van Delden C, Pesci EC, Pearson JP, Iglewski BH (1998). Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. *Infect. Immun.* **66**: 4499-4502.
- van Delden C, Comte R, Bally M (2001). Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* **183**: 5376-5384.
- van der Rest ME, Frank C, Molenaar D (2000). Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 6892-6899.
- Vander Wauden C, Pierard A, Kley-Raymann M, Haas D (1984). *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J. Bacteriol* **160**: 928-934.
- Venturi V (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 274-291.
- Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, Pesci EC (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* **187**: 4372-4380.
- Walters MC, 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother* **47**: 317-323.
- Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law H-Y, Farrall M, Cooke H, Eiberg H, Williamson R (1985). Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* **318**: 384-385.
- Waterman D, Fraser PD, Bramley PM, Przyborowska AM, Patel RKP, Gröger T, Halket JM (2004). GCMS and LCMSMS techniques for metabolic profiling of genetically modified foods. In: Ashcroft AE, Brenton G, Monaghan JJ, eds. *Advances in mass spectrometry*, Vol. **16**, CD Supplement, Abstract 876, Elsevier.
- Weber F, Isken JS, de Bont JA (1994). Cis/trans isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**: 2013-2017.
- Welch BL (1947). The generalisation of students problem when several different population variances are involved. *Biometrika* **34**: 23-35.
- Wendisch VF, de Graaf AA, Sahm H, Eikmanns BJ (2000). Quantitative determination of metabolic fluxes during countilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *Bacteriol.* **182**: 3088-96.
- Weuster-Botz D (1997). Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal. Biochem.* **246**: 225-233.
- Wiehlmann L (2001) Sequenzspezifizierte Transposonmutagenese (STM) in *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation. Fachbereich Chemie Universität Hannover.
- Wiehlmann L, Salunkhe P, Larbig K, Ritzka M, Tümmler B (2002). Signature tagged mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Lett* **1**: 131-139.
- Whitely M, Lee KM, Greenberg EP (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **96**: 13904-13909.
- Whitely M, Banger MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864.
- Whipp MJ, Camakaris H, Pittard AJ (1998). Cloning and analysis of the shiA gene, which encodes the shikimate transpor system of *Escherichia coli* K-12. *Gene.* **16**: 185-192.
- Whitfield C, Kaniuk N, Fridrich E (2003). Molecular insights into the assembly and diversity of the outer core oligosaccharide in lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and *Salmonella*. *J. Endotoxin Res.* **9**: 244-249.
- Williams DR, Rowe JJ, Romero P, Eagon RG (1978). Denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*: some parameters of growth and active transport. *Appl. Env. Microbiol.* **36**: 257-263.
- Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1119-1134.
- Winsor, GL, Lo R, Sui SJ, Ung KS, Huang S, Cheng D, Ching WK, Hancock RE, Brinkman FS

- (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Genome Database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Res* **33**: D338-343.
- Wittmann C, Krömer JO, Kiefer P, Binz T, Heinzle E (2004). Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal Biochem*. **327**: 135-139.
- Wollrab, (2002). Organische Chemie: Eine Einführung für Lehramts- und Nebenfachstudenten. *Springer-Lehrbuch Series* 2 ed..
- Woods DE, Sokol PA, Bryan LE, Storey DG, Mattingly SJ, Vogel HJ, Ceri H (1991). *In vivo* regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J Infect Dis* **163**: 143-149.
- Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **109**: 317-325.
- Xiao G, He J, Rahme LG. 2006. Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology*. **152**: 1679-86.
- Yamazaki M, Nakajima J-i, Yamanashi M, Sugiyama M, Makita Y, Springob K, Awazuhara M, Saito K (2003). Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*. *Phytochemistry* **62**: 987-995.
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yin Y und Kirsch JF (2007). Identification of functional paralog shift mutations: conversion of *Escherichia coli* malate dehydrogenase to a lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 17353-17357.
- Yokota A & Lindley ND, (2005). Central metabolism: sugar uptake and conversion, In Handbook of *Corynebacterium glutamicum* 215- Edited by L. Eggeling & M. Bott. Boca Raton: CRC Press.
- Yukawa H, Omumasaba CA, Nonaka H, Kós P, Okai N, Suzuki N, Suda M, Tsuge Y, Watanabe J, Ikeda Y, Vertés AA Inui M (2007). Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* and complete genome sequence of the strain R. *Microbiol*. **153**: 1042-1058.
- Zierdt CH, Schmidt PJ (1964). Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. **87**: 1003-1010.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	Systembiologie als Einheit und ihre unterschiedlichen Disziplinen.....	1
Abb. 2.	Überlappende Terminologien experimenteller Strategien zur Metabolomanalyse.....	3
Abb. 3.	Fließschema einer Standard-Metabolom-Analyse-Prozedur.....	4
Abb. 4.	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Liblé, 2005)...	9
Abb. 5.	Chromosom von <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/graphs_cgview.html).....	10
Abb. 6.	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Nguyen, 2008)...	12
Abb. 7.	Chromosom von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/graphs_cgview.html).....	13
Abb. 8.	Schematisches Modell der pathogenen Ereignisse, die zur chronischen <i>P. aeruginosa</i> - Infektion in den Atemwegen von CF-Patienten führen (Worlitzsch et al., 2002). a. Gesunde Lungenepithelien; b-f. CF-Lungenepithelien.....	15
Abb. 9.	Genetische Adaptation von <i>P. aeruginosa</i> während akuter & chronischer CF- Infektionen (nach Nguyen, 2006).	16
Abb. 10.	Regulation des Las- und Rhl-Quorum-Sensing Systems in <i>P. aeruginosa</i> (Venturi, 2006). Pfeile an den Promoterregionen der angezeigten Gene stehen für positive Regulation, wohingegen eine Linie Repression bedeutet.....	17
Abb. 11.	Zwei Wege des Hexose-Abbaus. Aus dem Entner-Doudoroff-Weg werden aus 1 Mol Glucose 1 Mol NADH + H ⁺ und 1 Mol ATP generiert, aus dem Embden- Meyerhoff-Weg aus 1 Mol Glucose 2 Mol NADH + H ⁺ und 2 Mol ATP.	18
Abb. 12.	Wachstumskurve einer batch-Fermentation (Crueger, 1989).....	23
Abb. 13.	Extraktionsmethode 1: Gleichzeitige Extraktion hydrophiler sowie hydrophober Phase.	36
Abb. 14.	Extraktionsmethode 2: Extraktion hydrophiler und hydrophober Phase.....	36
Abb. 15.	Gemeinsame Aufarbeitung der hydrophoben Phase aus Extraktionsmethode 1 und 2.	36
Abb. 16.	Extraktionsmethode 3.....	37
Abb. 17.	Bei der Gaschromatographie verwendetes Temperaturprofil.....	39
Abb. 18.	QuanBrowser 1.2 (Xcalibur). In der File Name Spalte befinden sich alle Proben. Darunter sind die zu der Substanz, die in der rechten Spalte gelistet sind, gehörenden Massenspuren zusammen mit der annotierten Fläche (grau) zu erkennen.....	41
Abb. 19.	Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Wachstumsverhalten von <i>C. glutamicum</i> während der Kultivierung im Schikanekolben (A) sowie im Fermenter (B).....	50
Abb. 20.	Fermentationsparameter bei der Kultivierung mit Glucose (A) und Quinat (B) von <i>C.</i> <i>glutamicum</i>	52
Abb. 21.	Schematische Darstellung der Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan- sowie der Shikimat-Biosynthese. Blaue Enzymnamen stellen in KEGG für <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 annotierte Enzyme dar. In runden Klammern wird die Relevanz der Datenbank- einträge (vgl. Kap. 2.7.1.2.) angegeben: [EC 2.5.1.54] 3-Deoxy-7-Phosphoheptulonat Synthase (Relevanz 0); [EC 4.2.3.4] 3-Dehydroquinat-Synthase (Relevanz 5); [EC 4.2.1.10] 3-Dehydroquinat- Dehydratase (Relevanz 5); [EC 1.1.1.25] Quinat/ Shikimat-Dehydrogenase (Relevanz 7); [EC 2.7.1.71] Shikimat Kinase (Relevanz 4); [EC 2.5.1.19] 3-Phos- phoshikimat 1-Carboxyvinyltransferase (Relevanz 4); [EC 4.2.3.5] 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-Phosphoshikimat Phosphatlyase (Relevanz 4); [EC 4.1.3.27] Chorismat Pyruvatlyase (Relevanz 5); [EC 2.4.2.18] Anthranilat Phosphoribosyltransferase (Relevanz 7); [EC 5.3.1.24] & [EC 4.1.1.48] Bifunktionale Indol-3- Glycerol Phosphat Synthase (Relevanz 4); [EC 4.2.1.20] Tryptophan Synthase Subunit beta (Relevanz 5); [EC 4.2.1.51] Prephenat Dehydrogenase (Relevanz 7); [EC 1.3.1.12] Prephenat Dehydrogenase (Relevanz 7); [EC 2.6.1.9] Histidinol-..... Phosphat Aminotransferase (Relevanz 7). Die roten Zahlen zeigen die in KEGG für <i>C.</i> <i>glutamicum</i> ATCC 13032 noch nicht annotierten Enzyme an: 1. [EC 1.1.1.24] Quinat- Dehydrogenase (Rele- vanz 0); 2. [EC 4.2.1.-] 3-Dehydroshikimat Hydrolyase QuiC; 3. [EC 5.4.99.5] Chorismat Pyruvatmutase (Relevanz 5); 4. [EC 2.6.1.57] Aromatische Amino- säure Transaminase; 5. [EC 1.3.1.43] Argonat Dehydrogenase (Relevanz 0).....	54

Abb. 22.	Darstellung einer PCA einer Glucose-Fermentation. Die Zahlen 1-48 symbolisieren die normierten Metabolitkonzentrationen aller stündlich entlang der Wachstumskurve entnommenen Proben. Die 1. und 2. Komponente der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 40%.....	58
Abb. 23.	Darstellung einer HCA einer Glucose-Fermentation. Die Zahlen 1-48 symbolisieren die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung entnommenen Proben. Die Farbgebung entspricht der in Abbildung 22. Hauptcluster 1 (Proben 1-24), Hauptcluster 2 (Proben 25-48).....	59
Abb. 24.	Darstellung einer PCA einer Quinat-Fermentation. Die Zahlen 1-30 symbolisieren die normierten Metabolitkonzentrationen aller stündlich entlang der Wachstumskurve entnommenen Proben. Die Pfeile deuten eine kreisförmige Anordnung der einzelnen Cluster an. Die 1. und 2. Komponente der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 45%.....	59
Abb. 25.	Darstellung einer HCA einer Quinat-Fermentation. Die Zahlen 1-30 symbolisieren die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung entnommenen Proben. Die Farbgebung entspricht der in Abbildung 24. Hauptcluster 1 (Proben 7-27), Hauptcluster 2 (Proben 1-6, 28-30).....	60
Abb. 26.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich exponentielle gegen stationäre Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >2.	62
Abb. 27.	Schematische Darstellung des Zitronensäurezyklus und Glyoxylat-Wegs, während der Kultivierung auf Quinat. Die Pfeile symbolisieren relative Zunahme (grün) und Abnahme (rot) von Metabolitkonzentrationen in der exponentiellen Wachstumsphase, verglichen mit der stationären.....	65
Abb. 28.	Darstellung der normierten Metabolitkonzentrationen aller entlang der Wachstumskurve entnommenen Proben aus der Quinat- sowie Glucose- Fermentation. Die blauen Punkte symbolisieren die Proben der Glucose- und die grünen die der Quinat-Fermentation. Die 1. und 3. Komponente der PCA beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 43%.....	67
Abb. 29.	Darstellung der normierten Metabolitkonzentrationen aller entlang der Wachstumskurve entnommenen Proben aus der Quinat (Q)- sowie Glucose (G)- Fermentation.	68
Abb. 30.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation gegen die Glucose-Fermentation in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	69
Abb. 31.	Quinat-Fermentation von <i>C. glutamicum</i> mit separat gesammeltem Mediumabfall. Verfärbung des Abfallmediums stellte sich nach 4 - 5 Stunden ein.....	77
Abb. 32.	Graphische Darstellung der Zeitspanne der Verfärbung nach Kulturentnahme aus der Quinat-Kultivierung im Fermenter.....	78
Abb. 33.	Fermentationsparameter während der Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> auf Quinat mit variiertem Sauerstoffpartialdruck. [A] 30% O ₂ ; [B] 30% O ₂ ; [C] 30%; [D] 15% O ₂ (t = 0min); [E] 0% O ₂ (t = 30min); [F] 0% O ₂ (t = 75min); [G] 30% O ₂ . Zeitangaben in Klammern nach Sauerstofflimitierung.....	79
Abb. 34.	Serienaufnahmen der Quinat-Fermentation von <i>C. glutamicum</i> mit variiertem Sauerstoffpartialdruck. [A] 30% O ₂ ; [B] 30% O ₂ ; [C] 30%; [D] 15% O ₂ (t = 0min); [E] 0% O ₂ (t = 30 min); [F] 0% O ₂ (t = 75 min); [G] 30% O ₂ . Zeitangaben in Klammern nach Sauerstofflimitierung.....	79
Abb. 35.	UV-Vis-Spektrum der Verfärbung eines <i>C. glutamicum</i> Kulturüberstandes bei Wachstum auf Quinat.....	80
Abb. 36.	Darstellung einer PCA der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck. Die Zahlen 1-43 symbolisieren die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung geernteten Proben. Die Farben entsprechen denen, die in Tab. 20 aufgeführt sind. 1. & 2. Komponente geben 40% der Gesamtvarianz wider.....	83
Abb. 37.	Darstellung einer HCA der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck. Die Zahlen 1-43 symbolisieren die über den gesamten Zeitraum der Kultivierung entnommenen Proben. Die Farben entsprechen denen, die in Ta- belle 20 aufgeführt sind. Das Hauptcluster 1 setzt sich aus den Proben 1-21 und 38-43 und Hauptcluster 2 aus den Proben 22-37 zusammen.....	84
Abb. 38.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-	

	Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich zweier mit einer Zeitdifferenz von einer Stunde geernteter Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase. Zeitpunkt C besitzt einen pO ₂ -Wert von 30%, Zeitpunkt D einen von 15%. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.....	86
Abb. 39.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich zweier mit einer Zeitdifferenz von 30 Minuten geernteter Proben. Zeitpunkt E hat einen pO ₂ -Wert von 0% und D einen von 15%. Markierte Metabolite mit der Abweichung um Faktor >3.....	87
Abb. 40.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich zweier mit einer Zeitdifferenz von 75 Minuten geernteter Proben. Zeitpunkt F hat einen pO ₂ -Wert von 0% und D einen von 15%. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.....	89
Abb. 41.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der Quinat-Fermentation. Dargestellt ist der Vergleich zweier mit einer Zeitdifferenz von 3.5 Stunden geernteter exponentieller Proben mit einem pO ₂ -Wert von annähernd 30%. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	90
Abb. 42.	PCA der Replikate der drei Referenzstämme im exponentiellen Wachstum. Die durchgezogene Linie umfasst die Medien mit undefinierter CasAA (pink), Trypton (orange), die gestrichelte Linie, die mit definierter Kohlenstoffquelle Citrat (hellblau), Cadaverin (grün), Glucose (blau), Glucose-Methionin (flieger) sowie Succinat (rot). 1. und 2. Komponente bilden 45% der Gesamtvarianz.....	95
Abb. 43.	PCA der Replikate der drei Referenzstämme aus dem exponentiellen Wachstum. Grobcluster durch orange und grüne Balken und Subcluster durch fliegerfarbene Dreikante markiert.....	95
Abb. 44.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit Trypton. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	99
Abb. 45.	Vorgeschlagener Stoffwechselweg der aromatischen Aminosäure und Quinolon/Quinolin-Biosynthese in <i>P. aeruginosa</i> . Doppelte Pfeilspitzen zeigen mehrere Schritte an. Die für die Quinolon/Quinolin Produktion entscheidenden Gene sind in Fettschrift gezeigt. Modifiziert nach Palmer et al. (2005).....	100
Abb. 46.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit CasAA. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	101
Abb. 47.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA14, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit CasAA. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	103
Abb. 48.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA14, verglichen mit TBCF10839, bei exponentiellem Wachstum mit CasAA. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >4.	104
Abb. 49.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit Cadaverin. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >4.	106
Abb. 50.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit Glucose. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	107
Abb. 51.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1, bei exponentiellem Wachstum mit Glucose- Methionin. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	110
Abb. 52.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA14, verglichen mit PAO1 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose- Methionin. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	112
Abb. 53.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA14, verglichen mit TBCF10839 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose- Methionin. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	112
Abb. 54.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1 auf Citrat in der exponentiellen Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	113

Abb. 55.	Vergleich mittlerer relativer Konzentrationen der Intermediate des Zitronensäurezyklus und Glyoxylat-Wegs der Referenzstämme TBCF10839 mit PAO1 bei exponentiellem Wachstum mit Citrat.....	116
Abb. 56.	Vergleich mittlerer relativer Konzentrationen der Intermediate des Zitronensäurezyklus und Glyoxylat-Wegs der Referenzstämme TBCF10839 und PAO1 bei exponentiellem (a) und stationärem (b) Wachstum mit Succinat.....	117
Abb. 57.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TBCF10839, verglichen mit PAO1 im exponentiellen Wachstum mit Succinat. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	118
Abb. 58.	PCA der gemittelten relativen Metabolitkonzentrationen der Replikate von TBCF10839 sowie der fünf TM auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen im exponentiellen und stationären Wachstum. Die durchgezogene Linie umfasst das Medium Trypton (orange), die gestrichelte die Medien Glucose (dunkelblau), Succinat (rot), Citrat (hellblau) und Cadaverin (grün). Die 1. und 2. Komponente beschreiben zusammen 45% der Gesamtvarianz.	124
Abb. 59.	HCA der gemittelten relativen Metabolitkonzentrationen der Replikate von TBCF10839 sowie der fünf TM auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen im exponentiellen und stationären Wachstum. Die farbigen Balken repräsentieren die Kohlenstoffquellen und die fliederfarbenen Dreikante Untercluster.....	124
Abb. 60.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Trypton in der exponentielle Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	127
Abb. 61.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Trypton in der stationären Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	129
Abb. 62.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Glucose in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	130
Abb. 63.	Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels in den TM D8A6, PA1436, PA1572 und PA5349 bei Wachstum auf Glucose. Rote Metabolite symbolisieren eine Verminderung, grüne eine Akkumulation der Metabolitkonzentrationen des relevanten Stoffwechselwegs im stationären, verglichen mit dem exponentiellen Wachstum. Die gestrichelten Linien deuten den putativen Syntheseweg von Norleucin & Norvalin in den TM D8A6, PA1436, PA1572, PA5349 an.	132
Abb. 64.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Citrat in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	133
Abb. 65.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Citrat in der stationären Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	134
Abb. 66.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA4640, verglichen mit TBCF10839 auf Citrat in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	135
Abb. 67.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Succinat in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	136
Abb. 68.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Succinat in der stationären Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	138
Abb. 69.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA5349, verglichen mit TBCF10839 auf Cadaverin in der exponentiellen Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	144
Abb. 70.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen der TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 auf Cadaverin in der stationären Wachstumsphase. Markierte Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	145
Abb. 71.	Modell des Quorum Sensing - Regulationsnetzwerkes in <i>P. aeruginosa</i> http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm (Reproduziert nach: Matthew et al., 2000).....	149
Abb. 72.	Vergleich der drei Extraktionsmethoden der hydrophoben Phasenseparation in	

	TBCF10839. Die Zahlen 1 - 19 stellen detektierte Metabolite (vgl. Tab. 43) dar.	151
Abb. 73.	Vergleich der Chromatogramme der hydrophoben Phasenextraktion der TM PA5349 sowie TBCF10839 in der exponentiellen und stationären Wachstums- phase unter Verwendung von Succinat (1 = TM PA5349-exp. (schwarz); 2 = TBCF10839-exp. (rot); 3 = PA5349-stat. (grün); 4 = TBCF10839 stat.(blau)). Die Kleinbuchstaben a - f markieren signifikant veränderte Metabolite.....	153
Abb. 74.	PCA der hydrophoben Phasenseparation der TM PA5349 und des TB CF10839 auf Succinat. (1 = TM PA5349-exp. (schwarz); 2 = TBCF10839-exp. (rot); 3 = TM PA5349-stat. (grün); 4 = TBCF10839 stat.(blau)). Die Komponenten 1 und 2 beschreiben zusammen eine Gesamtvarianz von 74 %.	154
Abb. 75.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests der TM PA5349 sowie des TBCF10839 in der exponentiellen (links) und stationären (rechts) Wachstumsphase auf Succinat. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,05$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	155
Abb. 76.	Wachstumsverhalten von <i>P. aeruginosa</i> CF-Patientenisolaten und Referenzstämmen bei Wachstum auf CasAA-Medium.....	158
Abb. 77.	Wachstumsverhalten von <i>P. aeruginosa</i> CF-Patientenisolaten und Referenzstämmen bei Wachstum auf Glucose-Methionin-Medium.	160
Abb. 78.	Vergleich der metabolischen Profile im exponentiellen Wachstum von PA14 sowie der Isolate Pat1 und Pat2 mit jeweils der frühen, mittleren und späten Isolate. Blaue Punkte stellen das CasAA-Medium, orange Punkte das Glucose-Methionin Medium dar. Die Komponenten 1 und 2 bilden 50% der Varianz.	163
Abb. 79.	PCA der metabolischen Profile von PA14 (petrol), der Patientenisolate Pat1A (blau), 1B (grün) und 1C (dunkelrot) bei exponentiellem Wachstum auf CasAA. Die Gesamtvarianz der 1. und 2. Komponente beträgt zusammen 61%.	164
Abb. 80.	HCA der metabolischen Profile von PA14 (petrol), der Patientenisolate Pat1A (blau), 1B (grün) und 1C (dunkelrot) bei exponentiellem Wachstum auf CasAA.....	165
Abb. 81.	Logarithmische Auftragung mittlerer relativer Metabolitkonzentrationen von Pat1A, verglichen mit PA14 auf CasAA in der exponentiellen Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	166
Abb. 82.	Intermediate aus dem Arginin- und Prolin-Metabolismus, der Polyamin-Biosynthese, dem β -Alanin-Metabolismus, Cystein- und Methionin- sowie AHL-Metabolismus. Grüne Intermediate symbolisieren eine Zunahme, rote eine Abnahme der Metabolitkonzentrationen in den Patientenisolaten Pat1A-1C, verglichen mit PA14, bei exponentiellem Wachstum auf CasAA.....	167
Abb. 83.	Logarithmische Auftragung mittlerer Metabolitkonzentrationen von Pat1B, verglichen mit PA14, auf CasAA in der exponentiellen Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	168
Abb. 84.	Logarithmische Auftragung mittlerer Metabolitkonzentrationen von Pat1C, verglichen mit PA14 auf CasAA in der exponentiellen Wachstumsphase. Markiert sind Metabolite mit einer Abweichung um Faktor >3.	169
Abb. 85.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1B, verglichen mit Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	170
Abb. 86.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C, verglichen mit Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	173
Abb. 87.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C, verglichen mit Pat1B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	174
Abb. 88.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B, verglichen mit Pat2A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	176

Abb. 89. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C verglichen mit Pat2A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	177
Abb. 90. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C, verglichen mit Pat2B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	179
Abb. 91. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Patientenisolat Pat1A (dunkelblau), Pat1B (dunkelgrün), Pat1C (dunkelrot), Pat2A (hellblau), Pat2B (hellgrün) sowie Pat2C (hellrot) auf CasAA-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Gesamtvarianz der Komponenten 1 und 2 beträgt 43 %.....	180
Abb. 92. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Patientenisolat Pat1A (dunkelblau), Pat1B (dunkelgrün), Pat1C (dunkelrot), Pat2A (hellblau), Pat2B (hellgrün) sowie Pat2C (hellrot) auf CasAA-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Buchstaben a-d (lila Dreikante) symbolisieren die Untercluster.	181
Abb. 93. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2A, verglichen mit Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	182
Abb. 94. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B, verglichen mit Pat1B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	183
Abb. 95. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C verglichen mit Pat1C auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	184
Abb. 96. Vergleich von PA14 (petrol) mit den Patientenisolaten Pat1A (blau), Pat1B (grün) sowie Pat1C (rot) auf Glucose-Methionin-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Gesamtvarianz der Komponenten 1 und 2 beträgt 56%.	185
Abb. 97. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Patientenisolat Pat1A (blau), Pat1B (grün) sowie Pat1C (rot) auf Glucose-Methionin-Medium in der exponentiellen Wachstumsphase.....	186
Abb. 98. Signifikante Änderungen anhand einer BETR des Referenzstammes PA14 und der Patientenisolat Pat1A, Pat1B sowie Pat1C auf Glucose-Methionin- Medium. Die Parameter waren: 1 Bedingung, 4 Zeitpunkte, Signifikanzlevel von $\alpha=0,01$. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	187
Abb. 99. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B, verglichen mit Pat2A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	190
Abb. 100. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C, verglichen mit Pat2A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T- Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	191
Abb. 101. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C, verglichen mit Pat2B auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T- Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	192
Abb. 102. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Isolate Pat1A (dunkel- blau), Pat1B (dunkelgrün), Pat1C (dunkelrot), Pat2A (hellblau), Pat2B (hell- grün) sowie Pat2C (hellrot) auf Glucose-Methionin-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Gesamtvarianz der Komponenten 1 und 2 beträgt 43 %.	193
Abb. 103. Vergleich des Referenzstammes PA14 (petrol) und der Patientenisolat Pat1A (dunkelblau), Pat1B (dunkelgrün), Pat1C (dunkelrot), Pat2A (hellblau), Pat2B (hellgrün) sowie Pat2C (hellrot) auf CasAA-Medium im exponentiellen Wachstum. Die Buchstaben a-d (lila Dreikante) symbolisieren die Untercluster.	194

Abb. 104. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2A, verglichen mit Pat1A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T- Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	195
Abb. 105. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B, verglichen mit Pat1B auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T- Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	196
Abb. 106. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C, verglichen mit Pat2C auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T- Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	198
Abb. 107. PCA der TM in Bezug auf den TBCF10839 bei Wachstum auf Succinat. D8A6, PA1436, PA1572, PA5349 exp. = dunkelblau; TBCF10839 exp. = dunkelgrün; D8A6, PA1436, PA1572, PA5349 stat. = hellblau; TBCF10839 stat. = hellgrün. (1. & 2. Komponente = 68% Gesamtvarianz).....	237

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Geräte.....	25
Tab. 2. Materialien für die Gaschromatographie/ Massenspektrometrie.....	25
Tab. 3. Software.....	26
Tab. 4. Datenbanken.....	26
Tab. 5. Allgemeine Lösungen.....	27
Tab. 6. Alkanmix.....	28
Tab. 7. Spurensalzlösung für MM1-Medium.....	29
Tab. 8. Spurensalzlösung für A10-Medium.....	29
Tab. 9. MM1-Grundstamm-Medium.....	29
Tab. 10. Komposition der Fermentationsmedien (1 L).....	30
Tab. 11. AB-Medium.....	30
Tab. 12. A10-Lösung.....	30
Tab. 13. Bakterienstämme und ihre Eigenschaften.....	31
Tab. 14. Fermentationsparameter einzelner Fermentationsbedingungen.....	33
Tab. 15. Für die Kalibrierung verwendete n-Alkane, ihr Retentionsindex und ihre ungefähre Retentionszeit.....	40
Tab. 16. Tabellarische Übersicht über durchgeführte Fermentationen.....	56
Tab. 17. Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der exponentiellen und stationären Wachstumsphasen der Quinat-Fermentation.....	63
Tab. 18. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat-, verglichen mit der Glucose-Fermentation bei exponentiellem Wachstum	70
Tab. 19. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite der Glucose-, Fructose-, Quinat-, Acetat-, Lactat- und Glutamin-Fermentation bei exponentiellem Wachstum	73
Tab. 20. Entnahmezeitpunkte in der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck mit der entsprechenden Probenbezeichnung sowie Sauerstoffkonzentration im Medium.....	83
Tab. 21. Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die in Abbildungen 33, 34 und Tabelle 19 mit den Buchstaben A-G gekennzeichneten Entnahmezeitpunkten	85
Tab. 22. Tabellarische Übersicht über die verschiedenen Versuchsansätze der drei Referenzstämme in der exponentiellen Wachstumsphase.....	93
Tab. 23. Vergleich der nach Pearson kalkulierten Korrelationskoeffizienten der relativen Metabolitkonzentrationen der Referenzstämme aus der exponentiellen Wachstumsphase bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	96
Tab. 24. Spezifische Wachstumsrate μ (h^{-1}) und Verdopplungszeit t (h) der Biomasse der Referenzstämme unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen.....	97
Tab. 25. Tabellarische Übersicht über detektierte Targets innerhalb der verschiedenen	

	Versuchsansätze der TM sowie des Referenzstammes im exponentiellen Wachstum. T = detektierte Targets insgesamt, davon nicht identifizierte Verbindungen (niV).....	122
Tab. 26.	Tabellarische Übersicht über detektierte Targets innerhalb der verschiedenen Versuchsansätze der TM sowie des Referenzstammes im stationären Wachstum. T = detektierte Targets insgesamt, davon nicht identifizierte Verbindungen (niV).....	122
Tab. 27.	Spezifische Wachstumsraten μ (h ⁻¹) sowie Verdopplungszeiten t (h) von den TM und TBCF10839 unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen.....	123
Tab. 28.	Nach Pearson kalkulierte Korrelationskoeffizienten der TM in Bezug auf den Referenzstamm TBCF10839 unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen in der exponentiellen sowie stationären Wachstumsphase.....	125
Tab. 29.	Erhöhte Genexpression der <i>P. aeruginosa</i> TM PA5349 im Bezug auf den Stamm TBCF10839 während des stationären Wachstums auf Succinat.....	138
Tab. 30.	Erhöhte Genexpression des <i>P. aeruginosa</i> -Stammes TBCF10839 im Bezug auf die TM PA5349 während des stationären Wachstums auf Succinat.....	142
Tab. 31.	Erhöhte Genexpression der <i>P. aeruginosa</i> TM PA5349 im Bezug auf den TBCF10839 während des stationären Wachstums auf Cadaverin.....	145
Tab. 32.	Erhöhte Genexpression des <i>P. aeruginosa</i> -Stammes TBCF10839 im Bezug auf die TM PA5349 während des stationären Wachstums auf Cadaverin.....	148
Tab. 33.	Detektierte Metabolite, die relativen Konzentrationen sowie der Standardfehler der hydrophoben Phasenseparation der Extraktionsmethoden 1 - 3	151
Tab. 34.	Charakteristiken der Cystische Fibrose-Patienten.....	156
Tab. 35.	Vergleich der spezifischen Wachstumsrate μ (h ⁻¹) und der Verdopplungszeit t(h) der Biomasse, der in Abbildung 58 gezeigten Kultivierungen auf CasAA.....	158
Tab. 36.	Vergleich der spezifischen Wachstumsrate μ (h ⁻¹) und der Verdopplungszeit t(h) der Biomasse, der in Abbildung 59 gezeigten Kultivierungen auf Glucose- Methionin.....	160
Tab. 37.	Tabellarische Übersicht über die verschiedenen Versuchsansätze sowie die detektierten Targets der <i>P. aeruginosa</i> CF-Isolate im exponentiellen Wachstum.....	162
Tab. 38.	Pearson Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen im exponentiellen Wachstum auf CasAA von PA14 sowie der Patienten isolate Pat1A-1C unter Angabe des relativen Gesamtfehlers der Metabolitkonzentrationen.....	165
Tab. 39.	Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums auf CasAA der Patienten isolate Pat2A-2C unter Angabe des relativen Gesamtfehlers der Metabolitkonzentrationen.....	175
Tab. 40.	Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums der <i>P. aeruginosa</i> -Isolate von Patient 1 und 2 auf CasAA-Medium entsprechend ihrer Isolation	181
Tab. 41.	Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums auf Glucose-Methionin von PA14 sowie der Isolate Pat1A-1C unter Angabe des relativen Gesamtfehlers der Metabolit- konzentrationen.....	186
Tab. 42.	Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums auf Glucose-Methionin der Patienten isolate Pat2A-2C unter Angabe des relativen Gesamtfehlers der Metabolitkonzentrationen.....	189
Tab. 43.	Paerson Korrelationskoeffizienten der Metabolitkonzentrationen innerhalb des exponentiellen Wachstums der Isolate von Patient 1 und 2 auf Glucose-Methionin- Medium.....	194
Tab. 44.	Parameter für die qualitative Prozessierung mit AMDIS.....	228
Tab. 45.	Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat- Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck (Zeitpunkt C/D).....	229
Tab. 46.	Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat- Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck (Zeitpunkt E/D).....	229
Tab. 47.	Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat- Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck (Zeitpunkt F/D).....	230
Tab. 48.	Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat- Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck (Zeitpunkt G/D).....	230
Tab. 49.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Trypton-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	231
Tab. 50.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der CasAA-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	231

Tab. 51.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA14 verglichen mit PAO1 der CasAA-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	231
Tab. 52.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA14 verglichen mit TBCF10839 der CasAA-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	232
Tab. 53.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Cadaverin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	233
Tab. 54.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Glucose-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	233
Tab. 55.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Glucose-Methionin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	234
Tab. 56.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA14 verglichen mit PAO1 der Glucose-Methionin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	234
Tab. 57.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA14 verglichen mit TBCF10839 der Glucose-Methionin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	235
Tab. 58.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Citrat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	235
Tab. 59.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Succinat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	236
Tab. 60.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Trypton-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	237
Tab. 61.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Trypton-Kultivierung im stationären Wachstum.....	238
Tab. 62.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Glucose-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	239
Tab. 63.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Citrat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	241
Tab. 64.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Citrat-Kultivierung im stationären Wachstum.....	243
Tab. 65.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA4640 verglichen mit TBCF10839 der Citrat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	244
Tab. 66.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Succinat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	245
Tab. 67.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Succinat-Kultivierung im stationären Wachstum.....	246
Tab. 68.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Cadaverin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	247
Tab. 69.	Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Cadaverin-Kultivierung im stationären Wachstum.....	248
Tab. 70.	Signifikante Änderungen anhand des T-Tests der TM PA5349 sowie des TBCF10839 in der exponentiellen Wachstumsphase auf Succinat. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,05$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	250
Tab. 71.	Signifikante Änderungen anhand des T-Tests der TM PA5349 sowie des TBCF10839 in der stationären Wachstumsphase auf Succinat. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,05$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	250
Tab. 72.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite vom Pat1A verglichen mit PA14 der CasAA- Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	251
Tab. 73.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite vom Pat1B verglichen mit PA14 der CasAA-Kultivierung im exponentiellen Wachstum.....	251
Tab. 74.	Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite vom Pat1C verglichen mit PA14 der CasAA- Kultivierung aus dem exponentiellen Wachstum.....	252
Tab. 75.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Test des Isolats Pat1B und Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$	253
Tab. 76.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C und Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen	

Tab. 91.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B und Pat1B auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$	269
Tab. 92.	Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C und Pat1C auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen ... mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$	271

7.3 Parameter für die qualitative Prozessierung mit AMDIS

Tab. 44. Parameter für die qualitative Prozessierung mit AMDIS

Parameter	Wert
<u>Indetif</u>	
Minimum match factor	50
Multiple identifications per compound	on
Show standard	off
Only reverse search	off
Type of analysis	RI Calibration/Performance bzw. Use RI Calibration Data
Use retention index (RI) for column	on
RI window	$5 + 0 \cdot 0.01 \text{ RI}$
Level	very strong
Maximum penalty	20
No RI in library	10
<u>Instrument</u>	
Low m/z auto	on
Low m/z	-
High m/z auto	on
High m/z	-
Threshold	off
Scan direction	low to high
Data file format	Xcalibur Raw File
Instrument type	Quadrupol
<u>Deconv</u>	
component width	12
Omit m/z	off
Adjacent peak subtraction	two
Resolution	high
Sensitivity	high
Shape requirements	medium
<u>QA/QC</u>	
Solvent tailing enabled?	on
Solvent tailing m/z	84
Column bleed enabled?	on
Column bleed m/z	207
<u>Batch job</u>	
Analysis Type	Use RI Calibration Data
Generate Report	on
Report all hits	off
Include only first hits	1
Instrument	Xcalibur Raw Files
All components	off
Only unidentified components	on
Only identified components	off
Add spectra	on
Replace spectra	off
Largest components	on (100)
All above threshold	off
Use Uncertain peaks	off

Die Parameter sind über Library → Build One Library... → Add All... einzugeben.

7.4 Vergleich semiquantitativer Intensitäten von Metaboliten der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck

Tab. 45. Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck (Zeitpunkt C/D)

Metabolite	MW Zustand C	Standard- fehler	MW Zustand D	Standard- fehler	Faktor Zustand C/D
Unknown#sst_cgl_088	19777	2291	2683	363	7.37
Unknown#sst_cgl_093	4085	1325	715	122	5.71
Unknown#sst_cgl_011	1012	82	12239	1925	0.08

Tab. 46. Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck (Zeitpunkt E/D)

Metabolite	MW Zustand E	Standard- fehler	MW Zustand D	Standard- fehler	Faktor Zustand E/D
Unknown#sst_cgl_078	34105	4331	1660	277	20.55
Tyrosine	1117709	41177	112055	17816	9.97
Unknown#sst_cgl_038	553226	89262	56559	7300	9.78
Unknown#sst_cgl_088	18710	7253	2683	363	6.97
Phenylalanin	441384	65181	81970	14327	5.38
β -Alanin	120848	16738	27102	2682	4.46
Prephenat	10368	1021	2569	76	4.03
Chorismat	98922	21238	27694	1261	3.57
Ornithin	86778	9691	25036	5519	3.47
Adenin	275158	40387	87314	14441	3.15
Glycin	50432	6906	17568	3582	2.9
Glyeron phosphat	1432	330	23908	6398	0.06
3-Dehydroshikimat	358	120	3595	255	0.1
Unknown#sst_cgl_123	14152.6	6350	119360	39658	0.12
Erythrose-4-phosphat	128	18	939	210	0.14
Fructose-1,6-bisphosphat	58729	6310	400981	61599	0.15
Unknown#sst_cgl_D09	439	108	2981	841	0.15
6-Phosphogluconat	4153	714	20986	717	0.2
Glucosamin-6-phosphat	1305	296	3978	484	0.33
2-Deoxyribose-5-phosphat	109	11	331	36	0.33
Malat	190906	29321	538188	24909	0.35
Fumarat	95862	16276	251866	17333	0.38

Tab. 47. Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck (Zeitpunkt F/D)

Metabolite	MW Zustand F	Standard- fehler	MW Zustand D	Standard- fehler	Faktor Zustand F/D
Unknown#sst_cgl_078	49770	2692	1660	278	29.99
Tyrosin	1179758	67806	112055	17817	10.53
Phenylpyruvat	4695	747	839	87	5.59
Pantothenat	19236	2139	4199	162	4.58
Phenylalanin	348503	65354	81970	14327	4.25
Unknown#sst_cgl_D05	3294	1439	948	110	3.47
Chorismat	93319	12710	27694	1260	3.37
Prephenat	6376	511	2569	76	2.48
β -Alanin	55314	10974	27102	2682	2.04
Glycin	31332	6745	17568	3581	1.78
Ornithin	37661	6129	25037	5519	1.51
Unknown#sst_cgl_D09	0	0	2982	842	0
Unknown#sst_cgl_123	2063	846	119360	39658	0.02
N-Acetyl-L-glutamin	684	98	20456	623	0.03
Fructose-1,6-bisphosphat	15304	5282	400981	61599	0.04
Unknown#sst_cgl_105	138	13	1787	234	0.08
Erythrose-4-phosphat	83	7.7	939	210	0.09
Glucosamin-6-phosphat	509	60	3978	484	0.13
6-Phosphogluconat	2902	520	20986	717	0.14
Glutamin	67567	19222	395207	54563	0.17
Fructose-6-phosphat	1440	223	5990	696	0.24
Serin	30454	3421	125003	21176	0.24
2-Deoxyribose-5-phosphat	93	5	331	35	0.28
Malat	159239	20852	538188	24908	0.29
Glucose-6-phosphat	52376	7786	168230	12942	0.31
3-Phosphoglycerat	275630	59050	813367	68473	0.34
Fumarat	86722	13922	251866	17333	0.34
2-Phosphoglycerat	29062	6083	79570	9408	0.37
Glyceron phosphat	9087	2732	23908	6398	0.38
N-Acetyl-L-glutamat	72519	6698	183049	4429	0.4
Succinat	542187	48865	1201876	34252	0.45

Tab. 48. Vergleich semiquantitativer Intensitäten ausgewählter Metabolite der Quinat-Fermentation mit variiertem Sauerstoffpartialdruck (Zeitpunkt G/D)

Metabolite	MW Zustand G	Standard- fehler	MW Zustand D	Standard- fehler	Faktor Zustand G/D
Erythrose-4-phosphat	939	210	138	13	6.79

Unknown#sst_cgl_D09	2982	841	561	245	5.31
Unknown#sst_cgl_033	11981	1123	2298	328	5.21
Unknown#sst_cgl_109	23339	2741	5189	1479	4.49
Unknown#sst_cgl_088	2683	363	49599	8880	0.05
Histidin	104	2.2	1771	780	0.06
N-Acetyl-L-glutamin	20455	623	232135	45210	0.08
Unknown#sst_cgl_093	714	122	6699	3402	0.11
Pantothenat	4199	162	33916	4128	0.12
Unknown#sst_cgl_100	779	119	4362	396	0.18
Unknown#sst_cgl_056	127	31	564	64	0.23

7.5 Vergleich semiquantitativer Intensitäten von Metaboliten der Referenzstämme bei Wachstum auf diversen Kohlenstoffquellen

Tab. 49. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Trypton-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TBCF10839	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor TBCF10839/PAO1
Unknown#sst_cgl_121	103197	2508	15376	291	6.71
Triethanolamin	101503	8122	16399	3391	6.19
Shikimat	583	197	7875	702	0.07
Cadaverin	1585	80	18961	391	0.08
Glutarat	14274	530	72463	4893	0.19

Tab. 50. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der CasAA-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TBCF10839	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor TBCF10839/PAO1
Serin	39275	3395	4983	483	7.88
Cadaverin	786	13	223	17	3.52
5-Aminopentanoat	1004	25	305	14	3.29

Tab. 51. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA14 verglichen mit PAO1 der CasAA-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW PA14	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor PA14/PAO1
UMP	5694	1451	0	0	
5-Aminopentanoat	22837	473	304	14	74.89
Cadaverin	5256	334	223	17	23.53
Trehalose	89782	2426	5241	230	17.13

Serine	58890	4998	4983	483	11.82
5'-Methylthioadenosin	3353	154	343	25	9.78
Uridin	12983	1517	1505	244	8.63
Ornithin	197851	7990	28767	1143	6.88
Glutarat	4948	146	743	183	6.66
4-Aminobenzoat	3607	219	639	76	5.65
Glycerol	45966	801	8219	169	5.59
Phosphoenolpyruvat	803	40	154	9	5.22
Valin	910975	24624	181407	13709	5.02
AMP	54473	3877	11037	602	4.94
Pyruvat	2399	139	519	78	4.62
Malat	5232	110	1278	75	4.09
Succinat	31032	864	10395	370	2.99
Glucose-6-phosphat	53851	1510	22044	1027	2.44
Fructose-6-phosphat	6693	308	2848	164	2.35
Spermidin	9983	2765	101695	5030	0.09
Tryptamin	6719	1643	66028	2644	0.1
Tryptophan	2766	241	11565	554	0.24
1,3-Diaminopropan	1187	24	3806	275	0.31
Tymin	4045	308	11905	2908	0.34
Unknown#bth_pae_062	4919	853	12162	647	0.4

Tab. 52. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA14 verglichen mit TBCF10839 der CasAA-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW PA14	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA14/TBCF10839
UMP	5694	1451	0	0	
5-Aminopentanoat	22837	473	1004	25	22.74
Trehalose	89782	2426	6854	187	13.09
Galactose	17928	3270	1933	78	6.91
Phosphoenolpyruvat	803	40	119	7	6.76
Cadaverin	5256	334	786	13	6.69
Adipat	5706	1447	863	49	6.62
5'-Methylthioadenosin	3353	154	589	49	5.69
Glycerol	45966	801	9155	327	5.02
Malat	5232	110	1057	81	4.95
N-Acetylglucosamin	2338	75	507	33	4.61
Glutarat	4948	146	1124	39	4.4
4-Aminobenzoat	3607	219	842	104	4.29
Glucose	36242	4790	8579	450	4.22
Ornithin	197851	7990	48696	2745	4.06

Valin	910975	24624	237692	8804	3.83
AMP	54473	3877	15538	1717	3.51
Succinat	31032	864	10749	406	2.89
Fructose-6-phosphat	6693	308	2844	139	2.35
Glucose-6-phosphat	53851	1510	25081	744	2.15
Spermidin	9983	2765	138088	13118	0.07
Tryptamin	6719	1643	84395	7417	0.08
Tryptophan	2766	241	15791	1239	0.18
1,3-Diaminopropan	1187	24	6132	269	0.19
Tymin	4045	308	17042	1648	0.24
Adenosin	10875	1323	38533	7520	0.28
Unknown#bth_pae_021	12954	561	41439	3468	0.31

Tab. 53. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Cadaverin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TBCF10839	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor TBCF10839/PAO1
Unknown#bth_pae_051	44456	14064	11026	1013	4.03

Tab. 54. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Glucose-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TBCF10839	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor TBCF10839/PAO1
Unknown#bth_pae_050	664	51	0	0	
Unknown#bth_pae_066	3097297	117477	167407	6130	18.51
Unknown#sst_cgl_122	18997	288	1414	319	13.44
2-Oxobutanoat	55995	1397	4380	1269	12.79
Trehalose	199322	9764	19659	5789	10.14
Thymin	330740	14435	44374	8801	7.45
Unknown#bth_pae_030	113683	5626	15476	2183	7.36
Shikimat	9569	295	1931	393	4.95
Unknown#sst_cgl_121	70105	5302	15165	1882	4.62
Cadaverin	2660	513	614	194	4.33
Cytosin	78011	2834	22679	2040	3.44
Glyceron phosphat	0	0	2829	325	
Nicotinat	14107	726	61730	3085	0.23
Ribose-5-phosphat	3166	122	13106	2473	0.24
α -Ketoglutarat	10810	254	31234	8113	0.35
Xylulose-5-phosphat	8755	279	23156	4286	0.38
Glucose-6-phosphat	110494	10929	263651	53763	0.42
Fructose-6-phosphat	11353	304	24805	7569	0.46

Tab. 55. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Glucose-Methionin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TBCF10839	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor TBCF10839/PAO1
Hypoxanthin	24050	3464	879	116	27.37
Shikimat	5948	319	484	133	12.28
Ornithin	17938	2355	3031	325	5.92
Tyrosin	390825	33757	86322	7990	4.53
Trehalose	25007	1087	8413	361	2.97
Phenylalanin	135035	5494	46071	1800	2.93
Phenylpyruvat	413	30	148	30	2.79
Unknown#sst_cgl_122	229	14	2660	618	0.09
Unknown#bth_pae_026	102	21	353	31	0.29

Tab. 56. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA14 verglichen mit PAO1 der Glucose-Methionin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW PA14	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor PA14/PAO1
Unknown#sst_cgl_015	3055	330	48	15	62.43
Benzoat	21315	232	1771	103	12
Shikimat	6680	1745	572	133	11.67
Unknown#sst_cgl_081	4269	821	426	36	10.02
Trehalose	98955	2195	9943	361	9.95
Glucosamin-6-phosphat	1219	417	218	27	5.58
1-Monopalmitoylglycerol	33998	5823	7449	2971	4.56
1-Monostearoylglycerol	1795	210	419	77	4.28
2-Hydroxyglutarat	5062	245	1193	117	4.24
1-Monooleoylglycerol	15228	2783	4361	1856	3.49
2-Monooleoylglycerol	770	161	224	49	3.44
5-Aminolevulinat	880	42	323	55	2.1
Glycerol	46668	1961	18275	947	2.55
Palmitat amid	10202	2589	4153	1763	2.46
Hypoxanthin	0	0	1039	116	
Phenylpyruvat	0	0	175	30	
Unknown#sst_cgl_077	16	6	432	93	0.04
Unknown#sst_cgl_120	128	10	817	67	0.16
Unknown#bth_pae_026	89	9	417	203	0.21
Unknown#sst_cgl_122	784	44	3144	618	0.25

Tab. 57. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA14 verglichen mit TBCF10839 der Glucose-Methionin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW PA14	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA14/TBCF10839
Unknown#bth_pae_050	572	23	0	0	
Unknown#sst_cgl_015	3055	330	14	4	225.96
Benzoat	21315	232	1507	113	14.14
1-Monopalmitoylglycerol	33998	5823	3938	604	8.63
1-Monooleoylglycerol	15228	2783	1777	285	8.57
1-Monostearoylglycerol	1795	210	323	41	5.56
Dodecanoat	37800	807	7413	447	5.1
2-Monooleoylglycerol	770	161	169	31	4.56
Unknown#bth_pae_018	2556	353	629	100	4.06
Unknown#bth_pae_068	82111	9052	22138	2761	3.71
Ethanolamin	130831	19234	35852	4917	3.65
Hexadecanoat	597313	53018	170540	19499	3.5
Palmitat amid	10202	2589	3549	487	2.87
Octadecanoat	99977	3337	37814	1698	2.64
Oleat amid	5881	1016	2265	449	2.61
Glycerol	46668	1961	18755	856	2.49
5-Aminolevulinat	880	42	358	22	2.45
Hypoxanthin	0	0	28860	3464	
Unknown#bth_pae_051	0	0	888	54	
Phenylpyruvat	0	0	495	30	
Unknown#sst_cgl_077	16	6	324	21	0.05
Unknown#sst_cgl_120	128	10	580	39	0.22
Tyrosin	124581	2726	468990	33757	0.27
Phenylalanin	77434	3926	216042	5495	0.36

Tab. 58. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Citrat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TBCF10839	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor TBCF10839/PAO1
Nicotinamid	2852	861	0	0	
Ornithin	1268	47	0	0	
Unknown#bth_pae_049	703	73	0	0	
Unknown#bth_pae_038	467	58	0	0	
Lysin	374	112	0	0	
Prolin	9654	1379	151	67	63.77
Cadaverin	3509	738	393	43	8.93
Homoserin	2156	363	405	81	5.32
5'-Methylthioadenosin	2395	93	935	152	2.56

Unknown#sst_cgl_090	0	0	206	50	
Xylulose-5-phosphat	0	0	31	3	
2-Hydroxyglutarat	576	80	7130	769	0.08
N-Acetylglucosamin	2434	179	10605	874	0.23
2-Hydroxybutanoat	596	45	2061	116	0.29
3-Hydroxybutyrat	3993	122	11623	456	0.34
2-Oxobutanoat	14245	949	35091	1118	0.4

Tab. 59. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von TBCF10839 verglichen mit PAO1 der Succinat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TBCF10839	Standard- fehler	MW PAO1	Standard- fehler	Faktor TBCF10839/PAO1
Cadaverin	979	17	0	0	
Unknown#bth_pae_045	153	17	0	0	
Diethylen glycol	85800	7	1466	70	58.53
Trehalose	21665	7.3	2182	35	9.93
Unknown#bth_pae_036	6027	36	907	183	6.65
5-Oxoprolin	328004	13	51733	949	6.34
Salicylat	1510	26	286	53	5.28
Unknown#bth_pae_027	712	31	161	13	4.42
Unknown#bth_pae_049	4491	14	1046	110	4.29
Unknown#bth_pae_066	454443	41	107370	25407	4.23
Cytosin	37021	24	9155	600	4.04
Octadecanoat	85564	8	21969	1350	3.89
Triethanolamin	976	7	254	107	3.84
Ethanolamin	146450	7	43249	2801	3.39
Thymin	58578	34	17877	3363	3.28
Dodecanoat	58270	16	25700	1717	2.27
1-Monostearoylglycerol	916	34	417	36	2.2
Unknown#sst_cgl_A16	0	0	269	29	
Ribose-5-phosphat	0	0	188	10	
Mannose-6-phosphat	29654	9	200150	8212	0.15
Glucosamin-6-phosphat	1126	47	6265	886	0.18
AMP	67174	33	317090	13370	0.21
6-Phosphogluconat	1017	13	3981	229	0.26
Hypoxanthin	21762	13	80971	3366	0.27
Tryptophan	131	13	462	109	0.28
Fructose-6-phosphat	7938	7	20409	939	0.39
5'-Methylthioadenosin	4762	16	11349	884	0.42
Glucose-6-phosphat	18975	8.7	42160	902	0.45

7.6 PCA der TM in Bezug auf den TBCF10839 bei Wachstum auf Succinat

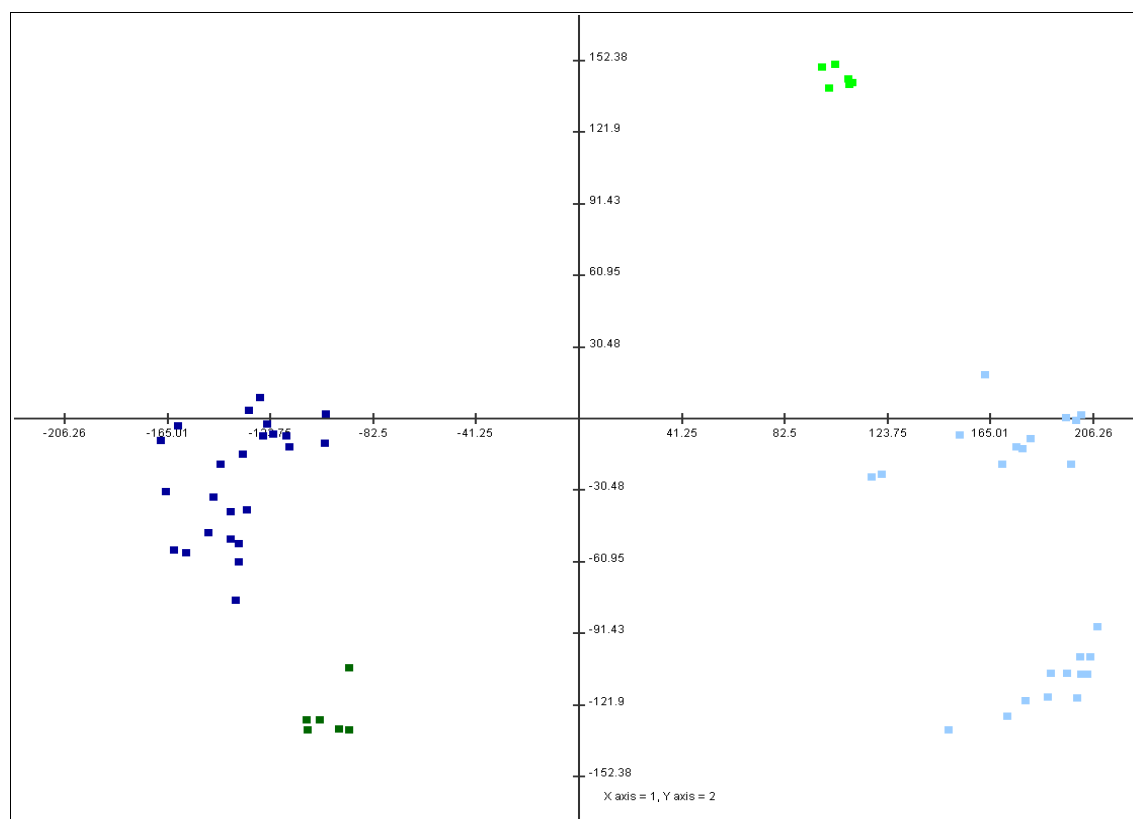


Abb. 107. PCA der TM in Bezug auf den TBCF10839 bei Wachstum auf Succinat. D8A6, PA1436, PA1572, PA5349 exp. = dunkelblau; TBCF10839 exp. = dunkelgrün; D8A6, PA1436, PA1572, PA5349 stat. = hellblau; TBCF10839 stat. = hellgrün. (1. & 2. Komponente = 68% Gesamtvarianz).

7.7 Vergleich semiquantitativer Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 mit TBCF10839 bei Wachstum auf diversen Kohlenstoffquellen

Tab. 60. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Trypton-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
2-Aminobenzoat	1035	215	0	0	
Unknown#bth_pae_010	1252	314	391	102	3.21
Triethanolamin	5824	1866	101503	81221	0.06
Unknown#sst_cgl_121	7359	520	103197	2509	0.07
Phosphoethanolamin	1087504	296959	3157221	31381	0.34

Tab. 61. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Trypton-Kultivierung im stationären Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
3-Dehydroshikimat	9065	1225	150	45	90.36
Shikimat	82977	4677	3438	277	24.14
Triethanolamin	276546	135597	20931	9651	13.21
Cytosin	121176	43559	11950	2483	10.14
Unknown#bth_pae_066	8427138	2636783	1336438	155921	6.31
Unknown#bth_pae_022	66447	20544	11059	2806	6.01
Unknown#bth_pae_030	52928	23143	9053	1438	5.85
Unknown#bth_pae_036	6321	2376	1116	170	5.67
2-Aminobenzoat	4439	1159	817	14	5.43
2-Hydroxyglutarat	9920	17	1841	102	5.39
Dihydroxyaceton	13895	1059	2786	334	4.99
Thymin	124145	36381	29254	4575	4.24
Oleat amid	77858	3767	19225	4812	4.05
Diethylen glycol	13317	1147	3803	1541	3.5
Unknown#bth_pae_068	140435	47626	44085	20768	3.19
Glyoxylat	238323	29246	77728	9971	3.07
Unknown#bth_pae_026	12342	878	4073	443	3.03
Unknown#bth_pae_062	63983	17567	21245	1856	3.01
Unknown#sst_cgl_094	243268	40900	81759	1244	2.98
2-Monooleoylglycerol	6997	2903	2475	1133	2.83
Homoserin	5783	902	2093	521	2.76
Hexadecanoat	8405931	2070353	3122423	1060290	2.69
Prolin	725779	60013	314929	14315	2.3
Nicotinat	177551	26386	79114	7859	2.24
Unknown#sst_cgl_012	4213	464	1896	447	2.22
Ribose	22988	4200	10591	810	2.17
Nicotinamid	999479	135523	463084	26552	2.16
Unknown#bth_pae_048	0	0	6098	2753	
Unknown#bth_pae_047	0	0	48500	260	
Unknown#bth_pae_035	0	0	724	45	
Unknown#sst_cgl_133	1988	622	165024	16267	0.01
AMP	79833	32645	5002121	218646	0.02
Lactose	578	173	21554	5006	0.03
Maltose	9517	592	316511	7441	0.03
Unknown#sst_cgl_122	6757	441	186464	2357	0.04
6-Phosphogluconat	2035	485	36852	3305	0.06
Glucose	114571	346	1724743	13084	0.07
Unknown#bth_pae_010	2971	23	40929	3831	0.07

3-Phosphoglycerat	4318	255	58546	8508	0.07
Unknown#sst_cgl_121	403873	43110	3527502	25891	0.11
Glucosamin-6-phosphat	15221	4405	98102	1715	0.16
N-Acetyl-glutamat	5423	1869	30942	2026	0.18
Glucono lacton	12053	790	59603	4080	0.2
Galactose	112259	5352	406139	51434	0.28
Uridin	210005	61420	698637	25006	0.3
Sucrose	197274	36503	635758	5773	0.31
Palmitat amid	219939	91194	700611	381716	0.31
Cystein	40817	5989	129394	23347	0.32
Unknwon#sst_cgl_046	21918	4951	68963	8378	0.32
Homocystein	8936	1234	25901	758	0.34
Unknown#sst_cgl_120	6904	1264	19522	5688	0.35
Trehalose	1727654	140213	4844633	63400	0.36
Mannose	31020	341	86854	3563	0.36
Unknown#sst_cgl_A10	10386	1638	27275	276	0.38
Glutamat	1903700	244150	4913026	157563	0.39
4-Aminobutanoat	7899	353	19455	3094	0.41

Tab. 62. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Glucose-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
Unknown#sst_cgl_041	1659	147	0	0	
Glyceron phosphat	961	128	0	0	
Unknown#sst_cgl_A08	679	557	0	0	
Unknown#sst_cgl_020	405	48	0	0	
Unknown#sst_cgl_040	3137	520	165	26	19.04
Unknown#sst_cgl_027	3268	509	465	64	7.04
Unknown#bth_pae_021	15650	1799	2680	354	5.84
Ribose-5-phosphat	3407	583	704	123	4.84
N-Acetylmannosamine	2368	644	528	104	4.48
Unknown#bth_pae_024	2255	677	508	169	4.44
Unknown#sst_cgl_095	2294	420	556	72	4.12
Unknown#sst_cgl_076	837.03	130	209	21	4.01
Ribulose-5-phosphat	262	39	66	9	3.99
Glucono lacton	20511	4592	5327	655	3.85
Xylulose-5-phosphat	6442	855	1946	280	3.31
Glyceraldehyd	2981	407	909	376	3.28
Unknown#sst_cgl_008	113412	44359	34796	13512	3.26
Unknown#bth_pae_017	45482	17869	14034	5364	3.24
Unknown#sst_cgl_090	17973	3525	6185	1650	2.91

Adenin	35313	4350	12298	1158	2.87
Adenosin	237292	34025	84961	22452	2.79
Tryptamin	379	129	136	25	2.79
5-Aminolevulinat	600	103	219	25	2.73
Orotat	972	209	357	29	2.73
Unknown#sst_cgl_119	85705	15067	31473	1973	2.72
Glucosamin-6-phosphat	3744	1471	1383	512	2.71
Erythrose-4-phosphat	355	45	137	41	2.59
Glutamin	14048	10491	5518	1660	2.55
Leucin	128680	18448	55437	2479	2.32
Threonin	46407	7388	20758	1686	2.24
Tyrosin	172596	33300	79022	9524	2.18
Mannose-6-phosphat	87563	16315	41563	12105	2.11
Isoleucin	101098	12634	48212	2941	2.1
Glucose-6-phosphat	79224	14747	37888	10929	2.09
6-Phosphogluconat	412	50	202	41	2.04
Homoserin	6685	1142	3287	924	2.03
Tryptophan	2081	250	1048	146	1.99
Fructose-6-phosphat	4886	862	2523	304	1.94
UMP	478	130	25143	1153	0.02
Diethylen glycol	2068	405	36672	1372	0.06
1-Monooleoylglycerol	901	287	9803	4556	0.09
Unknown#bth_pae_044	264	34	2411	659	0.11
Trehalose	5004	743	44294	9764	0.11
Cadaverin	69	4	591	51	0.12
Palmitat amid	1539	318	12223	3857	0.13
5-Aminopentanoat	125	18	944	113	0.13
Oleat amid	1526	331	9501	3877	0.16
O-Phospho-serin	681	244	4107	608	0.17
1-Monopalmitoylglycerol	3021	772	17525	7823	0.17
3-Hydroxybutyrat	368	97	2034	160	0.18
2-Oxobutanoat	2880	1400	12443	1397	0.23
Unknown#sst_cgl_109	108	36	429	69	0.25
Benzoat	7865	2060	31159	818	0.25
Spermidin	52899	10556	204992	19284	0.26
Unknown#bth_pae_068	6818	1911	24034	8437	0.28
Unknown#sst_cgl_002	1567	242	5479	349	0.29
Hexadecanoat	54457	9982	186638	53558	0.29
Shikimat	666	86	2126	296	0.31
Unknown#sst_cgl_122	1344	86	4222	288	0.32
Lactose	1517	141	4766	657	0.32
Thymin	26202	4084	73498	14436	0.36

2-Monooleoylglycerol	126	33	330	164	0.38
Phosphoenolpyruvat	1950	861	5049	667	0.39
Phosphoethanolamin	18071	1582	41583	5169	0.43
Quebrachitol	115	8	261	72	0.44
Fructose	1786	181	3964	443	0.45
Unknown#sst_cgl_038	11967	2274	26454	3734	0.45
Glutarat	741	35	1590	189	0.47
Glycolat	559	105	1174	124	0.48
Octadecanol	1381	77	2731	461	0.51
Octadecanoat	19742	1851	38515	3919	0.51
Dodecanoat	16609	3459	32271	3348	0.51
1-Monostearoylglycerol	490	78	908	362	0.54

Tab. 63. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Citrat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
Unknown#sst_cgl_119	12623	1397	0	0	
Thymin	2736	121	0	0	
Fructose-6-phosphat	2411	198	0	0	
Xylulose-5-phosphat	739	72	0	0	
Unknown#bth_pae_045	217	13	0	0	
Unknown#bth_pae_010	95	17	0	0	
Glucose-6-phosphat	42852	3020	2429	126	17.64
Nicotinamid	46512	4485	2852	862	16.31
Unknown#sst_cgl_027	15271	2416	1442	136	10.59
Adenosin	161903	46906	16725	2097	9.68
Unknown#sst_cgl_035	8344	1131	1227	95	6.8
Homoserin	10352	635	2156	364	4.80
Fructose	8164	47	1749	82	4.67
Prolin	42521	2284	9654	1379	4.40
Threonin	14390	1112	3397	215	4.24
Ornithin	5104	563	1268	48	4.02
Tryptophan	3272	365	819	51	3.99
Valin	588031	16052	160941	3450	3.65
Unknown#bth_pae_065	18158	3721	5085	169	3.57
Ribose-5-phosphat	1139	75	364	21	3.13
Aspartat	356554	16086	124312	4545	2.87
Unknown#sst_cgl_D05	595	56	209	19	2.84
Uracil	82087	2321	31449	2209	2.61
Unknown#sst_cgl_100	2513	213	963	60	2.61
4-Aminobutanoat	7613	104	2931	129	2.60

Unknown#bth_pae_066	16509	5098	6360	865	2.60
Mannose-6-phosphat	6665	545	2600	96	2.56
Methionin	8558	131	3423	133	2.50
Glyceron phosphat	554	50	223	27	2.49
2-Hydroxyglutarat	1428	166	576	80	2.48
Unknown#bth_pae_021	22939	1106	9794	167	2.34
Unknown#sst_cgl_008	151679	8872	64773	2514	2.34
Uridin	60470	5913	26174	3640	2.31
5'-Methylthioadenosin	5456	125	2395	94	2.28
Unknown#bth_pae_064	824	25	365	15	2.26
Glycin	23239	666	10409	350	2.23
Lactat	390516	10135	177579	12260	2.20
Unknown#sst_cgl_009	647	29	297	12	2.18
N-Acetyl-glutamat	30507	2258	15279	475	2.00
Cadaverin	0	0	3509	738	
Unknown#sst_cgl_120	0	0	1979	90	
Unknown#bth_pae_044	0	0	701	113	
Trehalose	3491	147	75798	1956	0.05
Unknown#sst_cgl_121	2354	78	38176	1415	0.06
1-Monopalmitoylglycerol	4471	570	47167	8420	0.09
1-Monooleoylglycerol	2031	348	21310	3862	0.10
Glutarat	614	50	4397	80	0.14
Hexadecanoat	74492	6000	412073	57816	0.18
Glucono lacton	1048	42	5555	118	0.19
Phosphoethanolamin	518	61	2698	440	0.19
Maltose	411	26	2000	84	0.21
Unknown#bth_pae_068	10068	1232	48114	7528	0.21
Palmitat amid	442	76	2017	382	0.22
2-Monooleoylglycerol	187	19	807	142	0.23
1-Monostearoylglycerol	564	53	2410	400	0.23
Glycolat	1068	118	4370	262	0.24
Oleat amid	1404	220	5445	878	0.26
Triethanolamin	873	95	3070	681	0.28
Sucrose	2789	359	9097	180	0.31
Unknown#bth_pae_039	22720	903	73366	3256	0.31
Mannose	8646	140	27001	393	0.32
Unknown#sst_cgl_122	6815	422	19840	916	0.34
Citrat	8520	525	21161	6392	0.40
Octadecanoat	27694	1272	63867	3685	0.43
Unknown#bth_pae_026	1458	69	2902	893	0.50
Glycerol	14227	564	28322	2806	0.50

Tab. 64. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Citrat-Kultivierung im stationären Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
Pipecolat	11141	430	906	265	12.30
Unknown#bth_pae_021	270737	3945	39607	1383	6.84
Unknown#bth_pae_066	58936	5799	8687	614	6.78
Cadaverin	2057	77	423	133	4.86
Unknown#bth_pae_022	4512	157	1190	195	3.79
Benzoat	30654	523	8983	261	3.41
Glyceraldehyd	3084	73	928	210	3.32
Unknown#bth_pae_042	1799	151	558	51	3.23
Triethanolamin	1801	151	559	46	3.22
Malonat	4117	79	1279	72	3.22
Diethyl glycol	52965	453	16533	1099	3.20
Hydroxylamin	24242	239	7789	1040	3.11
Tetradecanol	3100	113	998	85	3.11
Lactat	143855	10412	47098	9244	3.05
Unknown#bth_pae_067	2535	83	912	216	2.78
2-Oxobutanoat	71209	3885	25870	5732	2.75
AMP	0	0	101091	14843	
Oleat amid	0	0	5892	768	
Cytosin	0	0	3457	1642	
Unknown#bth_pae_009	0	0	2277	392	
Unknown#bth_pae_044	0	0	2024	264	
Phosphoenolpyrvat	0	0	1297	309	
Unknown#bth_pae_045	0	0	517	102	
Fructose-6-phosphat	0	0	448	115	
Unknown#bth_pae_064	0	0	358	90	
Unknown#bth_pae_014	0	0	224	90	
Unknown#bth_pae_047	0	0	206	40	
Uridine	6511	392	167621	29916	0.04
Unknown#sst_cgl_121	978	27	18068	3300	0.05
Trehaloe	3903	220	51268	11648	0.08
Glycerol	23607	1641	164121	108963	0.14
Unknown#sst_cgl_095	446	13	2475	991	0.18
Palmitat amid	874	71	4673	422	0.19
1-Monooleoylglycerol	2401	147	12025	1729	0.20
Tyrosin	51848	1117	190773	76154	0.27
Threonin	10122	148	36084	16497	0.28
Xylose	2169	93	7100	1318	0.31
Glucose	14308	288	46558	13014	0.31

5'-Methylthioadenosin	11302	249	35599	5837	0.32
Methionin	6159	187	19138	7468	0.32
Ornithin	25713	1024	79840	15334	0.32
Phosphoethanolamin	6719	247	20816	3921	0.32
Asparat	46289	1396	120697	57277	0.38
Glucose-6-phosphat	5005	102	12442	3157	0.40
Nicotinat	6366	163	15471	3900	0.41
Mannose-6-phosphat	5716	112	13350	3499	0.43
Glutamat	568460	26132	1319530	266234	0.43
Valin	64282	656	146310	51680	0.44
2-Monooleoylglycerol	370	18	831	93	0.45
N-Acetyl-glutamat	978	42	2135	518	0.46
1-Monopamitoylglycerol	15039	664	32833	4877	0.46
1-Monostearoylglycerol	802	16	1707	143	0.47
Prolin	25603	544	53845	21421	0.48

Tab. 65. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite von PA4640 verglichen mit TBCF10839 der Citrat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
Thymin	1162	158	0	0	
Unknown#bth_pae_010	645	33	0	0	
Fructose-6-phosphat	565	24	0	0	
Unknown#bth_pae_045	198	8	0	0	
Lysin	65662	11290	374	112	175.52
Ornithin	38303	2278	1268	48	30.2
Nicotinamid	22851	2113	2852	862	8.01
Adenosin	110493	20342	16725	2097	6.61
Glucose-6-phosphat	14290	753	2429	126	5.88
Tryptophan	3423	208	819	51	4.18
Mannitol	3525	2934	848	40	4.16
Malat	9498	563	2536	267	3.74
Glutarat	16007	770	4397	80	3.64
Fumarat	28481	834	11614	514	2.45
2-Hydroxybutanoat	1433	116	596	46	2.41
2-Hydroxyglutarat	1307	111	576	80	2.27
3-Hydroxybutyrat	8986	431	3993	123	2.25
Homoserin	4584	381	2156	364	2.13
Unknown#sst_cgl_120	0	0	1979	90	
Unknown#bth_pae_044	0	0	701	113	
Quinat	0	0	306	16	
1-Monooleoylglycerol	792	72	21310	3862	0.04

1-Monopalmitoylglycerol	2950	229	47167	8420	0.06
Palmitat amid	175	26	2017	382	0.09
Unknown#bth_pae_068	4895	428	48114	7528	0.1
Oleat amid	679	150	5445	878	0.12
2-Monooleoylglycerol	118	15	807	142	0.15
1-Monostearoylglycerol	394	30	2410	400	0.16
Hexadecanoat	72716	2741	412073	57816	0.18
Citrat	4509	462	21161	6392	0.21
Glycolat	1118	99	4370	262	0.26
Trehalose	22077	1073	75798	1956	0.29
Ethanolamin	50229	4614	142748	28901	0.35
Glycerol	10400	435	28322	2806	0.37
Unknown#sst_cgl_A17	4533	189	11817	311	0.38
Unknown#sst_cgl_037	2077	165	5386	621	0.39
Octadecanoat	26784	397	63867	3685	0.42
Phosphoethanolamin	1226	103	2698	440	0.45
Unknown#sst_cgl_121	17617	896	38176	1415	0.46
Glucono lacton	2777	137	5555	118	0.5
Octadecanol	574	24	1053	66	0.55

Tab. 66. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Succinat-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
Mannose	5198	821	180	35	28.94
Octadecanol	9937	1371	1007	73	9.87
Glutamin	7238	1742	795	327	9.11
Unknown#sst_cgl_100	9051	1005	1361	157	6.65
Unknown#sst_cgl_107	3666	441	649	118	5.65
Unknown#bth_pae_068	111932	7867	21814	3235	5.13
O-Phospho-serin	1277	58	269	79	4.75
Unknown#sst_cgl_120	843	43	211	24	3.99
Tetradecanol	42627	6259	11754	1861	3.63
Unknown#sst_cgl_A04	1199	52	354	31	3.39
Tryptophan	359	31	131	17	2.73
6-Phosphogluconat	2752	138	1017	135	2.71
Hexadecanoat	545429	31209	208192	23308	2.62
Hydroxylamin	47570	630	18428	960	2.58
Putrescin	613542	42439	238768	25776	2.57
1-Monopalmitoylglycerol	19650	2114	8080	1463	2.43
Leucin	165318	10804	71743	8287	2.30
1,3-Diaminopropan	16147	1176	7048	606	2.29

2-Monooleoylglycerol	388	44	170	30	2.28
AMP	152821	14902	67174	22435	2.27
Palmitat amid	12261	872	5721	1735	2.14
Galactosamin	1950	114	914	172	2.13
5'-Methylthioadenosin	10146	451	4762	766	2.13
Unknown#bth_pae_042	0	0	983	83	
Unknown#bth_pae_045	0	0	153	26	
Unknown#bth_pae_035	0	0	86	6	
Unknown#bth_pae_066	19337	1112	454443	187590	0.04
Unknown#bth_pae_036	447	19	6027	2200	0.07
Cadaverin	92	13	979	171	0.09
Unknown#sst_cgl_121	674	101	3357	240	0.20
Thymin	13710	836	58578	20378	0.23
Cytosin	10782	772	37021	8900	0.29
Adenosin	20005	1308	60729	16987	0.33
Ornithin	5911	441	17917	3735	0.33
Unknown#bth_pae_022	1116	58	3232	1249	0.35
Unknown#sst_cgl_035	10348	1104	27418	3166	0.38
Unknown#bth_pae_030	7804	540	20645	5148	0.38
Unknown#sst_cgl_038	6173	427	16218	7540	0.38
Unknown#bth_pae_014	99	10	260	47	0.38
Unknown#bth_pae_029	537	29	1311	82	0.41
Unknown#bth_pae_039	13015	486	31118	1541	0.42

Tab. 67. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Succinat-Kultivierung im stationären Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
Oleat amid	1446	26	0	0	
Oxalat	1071	23	0	0	
Unknown#sst cgl A17	12972	332	318	20	40.85
Unknown#sst cgl 040	4294	61	164	11	26.12
Unknown#sst cgl A10	31683	205	1950	112	16.24
N-Acetylglucosamin	2195	62	205	8	10.69
Octadecanol	8835	229	1561	166	5.66
UMP	170599	5478	30199	9256	5.65
Hexadecanol	7055	121	1342	132	5.26
2-Aminoadipat	21792	666	5715	768	3.81
Unknown#sst cgl 094	106204	2449	27945	1584	3.80
Lysin	6743607	73616	1863589	92639	3.62
Quebrachitol	6985	82	2005	100	3.48

Unknown#bth pae 017	677892	21999	209729	17281	3.23
Unknown#bth pae 056	54534	975	16970	865	3.21
Unknown#bth pae 021	9952	259	3250	369	3.06
Glycerol	74043	1294	27127	4861	2.73
Unknown#bth pae 045	0	0	442	100	
Unknown#bth pae 028	0	0	329	78	
2-Monooleoylglycerol	0	0	197	47	
Trehalose	15746	680	897173	27369	0.02
Maltose	19692	851	1096827	32073	0.02
Unknown#bth pae 066	19789	654	774006	339825	0.03
Unknown#sst cgl 121	3505	73	82376	6904	0.04
Glutamin	240	19	2207	551	0.11
Unknown#bth pae 030	5161	188	39929	19330	0.13
Mannose	17255	383	132418	31065	0.13
Unknown#sst cgl 038	41070	925	246890	73560	0.17
Pyrrol-2-carboxylat	824	23	4060	904	0.20
Unknown#bth pae 009	6365	377	29246	4903	0.22
Unknown#sst cgl 002	2739	82	10272	1463	0.27
Unknown#bth pae 024	1195	47	3868	619	0.31
Unknown#bth pae 020	13975	466	42912	6497	0.33
Glucose	54148	1007	158842	29067	0.34
Palmitat amid	10624	206	30513	4432	0.35
N-Acetyl-glutamat	2274	71	6353	654	0.36
Unknown#bth pae 018	3295	163	9043	1634	0.36
Ethanolamin	177796	8591	484536	81153	0.37
Glyceraldehyd	3936	72	10680	640	0.37
1-Monooleoylglycerol	2034	43	5459	1068	0.37
Spermidin	134838	3483	361282	105977	0.37

Tab. 68. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Cadaverin-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
Cytosin	3294	757	550	100	5.99
Unknown#bth pae 030	1339	283	246	26	5.44
Adenosin	21085	5120	4210	718	5.01
Unknown#bth pae 036	182	47	52	8	3.51
Glyceraldehyd	270	89	83	11	3.23
Thymin	3843	678	1222	81	3.14
Nicotinamid	15549	1814	5612	781	2.77
Unknown#bth pae 009	230	69	86	20	2.68

Phenylalanin	1793	431	678	97	2.64
Glutarat	6936	2929	3012	1248	2.30
Homoserin	343	69	153	11	2.24
Trehalose	7432	4306	120159	37615	0.06
Palmitat amid	623	162	3599	485	0.17
Unknown#bth pae 032	917	269	3262	205	0.28
1-Monooleoylglycerol	358	84	1261	153	0.28
1-Monopalmitoylglycerol	1527	325	5183	713	0.29
Oleat amid	358	98	1154	236	0.31
1-Monostearoylglycerol	102	15	278	32	0.37
2-Monooleoylglycerol	38	8	92	14	0.41

Tab. 69. Semiquantitative Intensitäten der Metabolite von TM PA5349 verglichen mit TBCF10839 der Cadaverin-Kultivierung im stationären Wachstum

Metabolite	MW TM PA5349	Standard- fehler	MW TBCF10839	Standard- fehler	Faktor PA5349/TBCF10839
Unknown#bth pae 010	7761	3156	0	0	
Unknown#sst cgl 053	1674	341	0	0	
UMP	5613	552	172	7	32.67
Unknown#bth pae 026	3472	1458	189	26	18.42
Methionin	16267	1072	1562	216	10.42
Unknown#bth pae 038	3161	73	313	9	10.11
Unknown#bth pae 059	1375	111	142	9	9.70
Unknown#bth pae 027	1052	84	120	12	8.76
Putrescin	24193	1295	3272	111	7.39
Unknown#bth pae 032	4630	2246	647	54	7.15
β-Alanin	7582	254	1366	26	5.55
Unknown#bth pae 056	28082	1234	5713	174	4.92
Threonin	26070	876	6293	559	4.14
Unknown#bth pae 065	1371	100	340	47	4.03
4-Aminobenzoat	4616	458	1238	70	3.73
Homoserin	1499	243	409	47	3.67
Uridin	13075	1343	3605	320	3.63
Malonat	8209	600	2447	276	3.36
5'-Methylthioadenosin	6946	561	2086	87	3.33
Serin	25156	1788	7763	663	3.24
Phenylalanin	4457	794	1398	191	3.19
Alanin	125097	4359	40541	5308	3.09
Glyceraldehyd	1216	123	413	17	2.94
Valin	44965	2312	15860	781	2.84
Xylulose-5-phosphat	337	49	119	6	2.83

Aspartat	126490	5393	45114	3871	2.80
Lactat	45294	3006	16513	598	2.74
Tryptophan	2554	142	934	57	2.74
Unknown#sst cgl A04	0	0	258	17	
Unknown#bth pae 028	0	0	50	4	
Arabinose	11	3	12530	512	
Lyxose	321	15	10090	703	0.03
Trehalose	27781	1361	250720	23966	0.11
Unknown#bth pae 013	130	10	888	21	0.15
2'-Deoxyguanosine 5'-phosphat	52	6	312	9	0.17
Glycerol	646	30	3685	313	0.18
Fructose-6-phosphat	59	10	311	19	0.19
Maltose	55251	2952	282671	26995	0.20
Ribose	2655	177	12702	898	0.21
4-Aminobutanoat	192	17	843	29	0.23
Unknown#sst cgl 100	437	26	1917	188	0.23
Fumarat	307	32	1340	104	0.23
Dodecanoat	2441	256	9578	357	0.25
1-Monopalmitoylglycerol	3164	420	10233	1040	0.31
Xylose-1-phosphat	48	5	149	9	0.32
1-Monooleoylglycerol	981	88	2923	339	0.34
1-Monostearoylglycerol	198	22	469	43	0.42

7.8 Varianzanalysen der hydrophoben Phase anhand des T-Tests der TM PA5349 und des TBCF10839 bei Wachstum auf Succinat

Tab. 70. Signifikante Änderungen anhand des T-Tests der TM PA5349 sowie des TBCF10839 in der exponentiellen Wachstumsphase auf Succinat. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,05$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite	t-Wert	p-Wert
Pentadecanoic acid	4.78	2.00E-03
14-Methylpentadecanoic acid	3.01	2.36E-02
cis-9,10-Methylenehexadecanoic acid	5.29	4.98E-04
Heptadecanoic acid	4.03	4.97E-03
2-Hydroxyhexadecanoic acid	3.21	1.83E-02
cis-9,10-Methyleneoctadecanoic acid	4.53	1.42E-03
Nonadecanoic acid	3.27	1.13E-02
Eicosanoic acid	3.55	7.54E-03
2-Hydroxyoctadecanoic acid	6.06	5.13E-04

Tab. 71. Signifikante Änderungen anhand des T-Tests der TM PA5349 sowie des TBCF10839 in der stationären Wachstumsphase auf Succinat. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,05$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite	t-Wert	p-Wert
Tetradecanoic acid	4.26	2.11E-03
14-Methylpentadecanoic acid	5.89	2.32E-04
cis-9,10-Methylenehexadecanoic acid	13.62	8.13E-07
Heptadecanoic acid	14.43	5.21E-07
2-Hydroxyhexadecanoic acid	3.45	1.83E-02
Octadecanoic acid	6.15	1.68E-04
cis-9,10-Methyleneoctadecanoic acid	7.47	3.80E-05
Nonadecanoic acid	8.52	2.77E-05
Eicosanoic acid	7.68	5.84E-05

7.9 Vergleich semiquantitativer Intensitäten von Metaboliten von *P. aeruginosa* Isolaten von CF-Patienten bei Wachstums auf CasAA

Tab. 72. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite vom Pat1A verglichen mit PA14 der CasAA- Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW Pat1A	Standard- fehler	MW PA14	Standard- fehler	Faktor Pat1A/PA14
Spermidin	179595	38621	9983	2765	17.99
Tryptamin	109376	22563	6719	1643	16.28
Tryptophan	21510	3793	2766	241	7.77
1,3-Diaminopropan	5487	350	1187	24	4.62
Cytosin	13480	1693	3216	287	4.19
Thymin	14498	1124	4045	308	3.58
Adenosin	38374	2640	10878	1323	3.53
Methionin	13707	1040	4989	480	2.75
Putrescin	296184	18947	121068	9475	2.45
UMP	0	0	5694	1451	
5-Aminopentanoat	212	18	22837	473	0.01
Cadaverin	211	24	5257	334	0.04
Glutarat	607	57	4948	146	0.12
Adipat	730	57	5706	1447	0.13
Trehalose	11958	339	89782	2427	0.13
Ornithin	40881	2446	197851	7991	0.21
4-Aminobutanoat	3485	94	15284	290	0.23
Glycerol	11566	860	45966	801	0.25
3-Hydroxybutyrat	6866	166	26100	448	0.26
5'-Methylthioadenosin	1015	78	3353	154	0.3

Tab. 73. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite vom Pat1B verglichen mit PA14 der CasAA-Kultivierung im exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW Pat1B	Standard- fehler	MW PA14	Standard- fehler	Faktor Pat1B/PA14
Methionin	42765	2927	4989	480	8.57
1,3-Diaminopropan	8914	1104	1187	24	7.51
Adenosin	77471	9839	10878	1323	7.12
Tryptamin	47712	5730	6719	1643	7.1
Spermidin	70849	9144	9983	2765	7.09
Tryptophan	16831	949	2766	241	6.08
Uridin	71877	6689	12983	1517	5.54
Cytosin	16685	2051	3216	287	5.19
Thymin	20244	2922	4045	308	5

Threonin	78453	4220	19119	1366	4.1
Serin	233410	19724	58890	4998	3.96
Adenin	35971	1022	9143	534	3.93
Lysin	1668113	75764	496883	18497	3.36
β -Alanin	48245	2443	14585	383	3.31
Putrescin	381893	38517	121068	9475	3.15
Leucin	655128	30182	229997	10482	2.85
UMP	0	0	5694	1451	
Trehalose	3084	117	89782	2427	0.03
5-Aminopentanoat	881	46	22837	473	0.04
Cadaverin	542	55	5257	334	0.1
Benzoat	3428	118	20027	426	0.17
Glycerol	11241	1098	45966	801	0.24
Glutarat	1229	71	4948	146	0.25

Tab. 74. Semiquantitative Intensitäten ausgewählter Metabolite vom Pat1C verglichen mit PA14 der CasAA- Kultivierung aus dem exponentiellen Wachstum

Metabolite	MW Pat1C	Standard- fehler	MW PA14	Standard- fehler	Faktor Pat1C/PA14
Methionin	34537	3568	4989	480	6.92
Adenosin	56773	9740	10878	1323	5.22
1,3-Diaminopropan	5883	462	1187	24	4.95
Threonin	84140	6353	19118	1366	4.4
Thymin	17777	1024	4045	308	4.39
Serin	241304	21099	58890	4998	4.09
Prolin	272372	26174	80740	8980	3.37
Spermidin	32290	2529	9982	2765	3.23
Tryptamin	20942	1513	6719	1643	3.12
Putrescin	315491	20595	121068	9475	2.61
Cytosin	8334	522	3216	287	2.59
Leucin	532121	33371	229997	10482	2.31
β -Alanin	33456	293	14585	383	2.29
Tryptophan	6316	268	2766	241	2.28
UMP	0	0	5694	1451	
Oleat amid	0	0	2268	485	
5-Aminopentanoat	291	9	22837	473	0.01
Trehalose	1486	35	89782	2427	0.03
Cadaverin	223	12	5257	334	0.1
3-Hydroxybutyrat	4216	33	26100	448	0.26
Glutarat	870	25	4948	146	0.25
Ornithin	39064	931	197851	7991	0.21

N-Acetylglucosamin	562	24	2338	74	0.24
4-Aminobutanoat	4277	54	15284	290	0.28

Tab. 75. Signifikante Änderungen anhand eines T-Test des Isolats Pat1B und Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat1A/Pat1B	t-Wert	p-Wert
1-Monooleoylglycerol	7.63	3.23E-05
1-Monopalmitoylglycerol	8.77	2.25E-05
1-Monostearoylglycerol	7.92	2.40E-05
Benzoat	7.16	8.25E-04
Dodecanoat	7.51	2.88E-04
Ethanolamin	3.51	6.66E-03
Glycerol-3-phosphat	3.86	4.83E-003
Glycerone phosphat	4.72	1.10E-03
Hexadecanoat	8.78	5.00E-05
Hydroxylamin	3.98	4.10E-03
Octadecanoat	4.98	1.10E-03
Octadecanol	3.86	3.87E-03
Oleat-amid	6.18	1.62E-04
Palmitat-amid	5.70	2.94E-04
Phosphoethanolamin	5.19	1.26E-03
Spermidin	5.38	3.00E-03
Trehalose	11.85	7.52E-05
Tryptamin	5.24	3.36E-03
Unknown#bth pae 039	9.92	1.78E-04
Unknown#bth pae 062	3.89	5.94E-03
Unknown#bth pae 068	7.97	2.28E-05

Metabolite Pat1B/Pat1A	t-Wert	p-Wert
3-Hydroxybutanoat	8.79	1.03E-05
4-Aminobutanoat	12.28	1.79E-06
5-Aminopentanoat	8.51	1.35E-05
5'-Methylthioadenosin	6.75	1.10E-03
5-Oxoprolin	7.59	6.36E-05
Adenin	5.15	1.32E-03
Aspartat	6.46	1.17E-04
beta-Alanin	10.74	1.97E-06
Cadaverin	3.90	5.86E-03
Citrat	6.21	4.40E-04
Fumarat	7.45	3.02E-04
Glucosamin	4.92	1.16E-03
Glucosamin-6-phosphat	6.75	2.65E-04

Glucose-6-phosphat	6.13	4.78E-04
Glutarat	5.61	5.03E-04
Glycin	3.95	4.25E-03
Isoleucin	8.25	1.71E-04
Leucin	22.86	2.78E-09
Lysin	18.77	1.59E-08
Malat	19.26	1.27E-08
Mannose-6-phosphat	4.91	8.41E-04
Methionin	4.60	2.48E-03
N-Acetyl-glutamat	10.41	4.61E-05
Nicotinamid	8.95	8.90E-06
Ornithin	10.04	5.65E-05
Pantothenat	3.77	4.40E-03
Ribose	4.00	3.12E-03
Ribose-5-phosphat	5.49	3.85E-04
Serin	3.96	5.43E-03
Succinat	4.71	1.10E-03
Threonin	6.14	2.76E-04
Tyrosin	8.44	1.51E-04
Unknown#bth pae 021	11.00	1.61E-06
Unknown#bth pae 024	4.17	2.40E-03
Unknown#bth pae 056	5.59	1.40E-03
Unknown#bth pae 065	7.43	1.46E-04
Urea	3.39	7.97E-03
Uridin	4.27	5.30E-03
Uridin-5'-monophosphat	4.53	2.70E-03
Valin	10.95	4.29E-006

Tab. 76. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C und Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat1A/Pat1C	t-Wert	p-Wert
1,3-Diaminopropan	4.37	3.26E-03
3-Hydroxybutanoat	5.33	4.73E-04
3-Phosphoglycerat	4.49	2.02E-03
4-Aminobutanoat	3.28	9.51E-03
Alanin	3.90	7.96E-03
Benzoat	3.70	4.94E-03
Ethanolamin	4.56	1.37E-03
Fructose	3.91	3.58E-03
Fructose-6-phosphat	3.66	5.24E-03
Glycerol-3-phosphat	6.85	7.47E-05
Glycerone phosphat	4.10	3.45E-03

Nicotinamid	4.78	1.01E-03
Oleat-amid	3.87	3.79E-03
Ornithin	4.86	1.83E-03
Pantothenat	4.84	9.23E-04
Putrescin	4.19	4.06E-03
Pyruvat	3.36	8.35E-03
Succinat	6.05	3.06E-04
Trehalose	5.35	4.65E-04
Unknown#bth pae 021	5.88	2.34E-04
Unknown#bth pae 039	5.31	4.90E-04

Metabolite Pat1C/Pat1A	t-Wert	p-Wert
4-Aminobenzoat	7.53	3.58E-05
Adipat	7.68	2.55E-04
Aspartat	3.63	5.47E-03
Citrat	4.32	1.94E-03
Fumarat	4.91	8.36E-04
Glucosamin	4.32	1.93E-03
Isoleucin	4.86	2.81E-03
Leucin	6.46	6.50E-04
Serin	7.16	5.31E-05
Threonin	6.95	6.66E-05
Unknown#bth pae 017	4.07	2.80E-03
Unknown#bth pae 024	6.85	2.41E-04
Urea	5.89	2.31E-04
Uridine-5'-monophosphat	3.66	8.10E-03
Valin	3.61	8.57E-003

Tab. 77. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C und Pat1B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat1B/Pat1C	t-Wert	p-Wert
Adenin	3.87	3.77E-03
Leucin	3.57	6.03E-03
Lysin	4.85	1.86E-03
Malat	3.54	6.27E-03
N-Acetyl-glutamat	4.39	1.74E-03
Nicotinamid	3.70	4.88E-03
Succinat	4.54	1.40E-03
Unknown#bth pae 021	3.69	4.96E-03
Valin	3.87	8.28E-03

Metabolite Pat1C/Pat1B	t-Wert	p-Wert
2-Oxobutanoat	3.97	7.40E-03
Hydroxylamin	5.88	2.34E-04
Unknown#bth pae 024	5.17	3.56E-03
Unknown#bth pae 068	3.85	3.89E-03
Uridine-5'-monophosphat	6.30	1.48E-03

Tab. 78. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B und Pat2A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat2A/ Pat2B	t-Wert	p-Wert
1,3-Diaminopropan	6.06	9.11E-04
1,6-Anhydro-beta-D-glucose	4.55	3.90E-03
1-Monooleoylglycerol	7.61	6.24E-05
1-Monopalmitoylglycerol	7.9	9.87E-05
1-Monostearoylglycerol	12.22	1.87E-06
2-Ketoglutarat	5.38	1.69E-03
4-Aminobenzoat	5.61	3.28E-04
6-Phosphogluconat	6.48	1.14E-04
Adenosin	4.49	6.48E-03
Benzoat	8.93	1.10E-04
Cytosin	5.85	2.07E-03
Dodecanoat	11.5	2.96E-06
Ethanolamin	3.7	4.88E-03
Fructose-6-phosphat	12.53	5.33E-07
Glucosamin-6-phosphat	5.51	1.50E-03
Glucose-6-phosphat	7.5	2.90E-04
Glutamat	8.05	1.97E-04
Glycerol-3-phosphat	9.25	1.51E-05
Hexadecanat	7.56	1.30E-04
Hydroxylamin	9.31	2.41E-04
Mannose-6-phosphat	7.77	2.39E-04
N-Acetyl-glutamat	3.91	3.55E-03
Octadecanoat	4.82	1.93E-03
Octadecanol	10.05	3.44E-06
Oleat-amid	5.14	1.34E-03
Palmitat-amid	4.41	6.95E-03
Phenylalanin	7.45	3.89E-05
Phosphoethanolamin	5.28	1.15E-03
Putrescin	5.06	2.30E-03
Ribulose-5-phosphat	9.37	8.38E-05
Spermidin	6.87	2.38E-04
Succinat methylester	10.44	1.61E-05

Trehalose	7.51	2.88E-04
Tryptamin	7.15	1.85E-04
Tryptophan	5.7	1.26E-03
Unknown#bth pae 016	3.6	8.73E-03
Unknown#bth pae 017	3.75	7.14E-03
Unknown#bth pae 021	4.02	3.00E-03
Unknown#bth pae 022	7.52	1.35E-04
Unknown#bth pae 062	14.57	1.46E-07
Unknown#bth pae 068	11.11	1.48E-06
Uracil	4.94	1.13E-03
Xylulose-5-phosphat	9.65	7.09E-05

Metabolite Pat2B/Pat2A	t-Wert	p-Wert
3-Phosphoglycerat	10.4	2.57E-06
5-Aminopentanoat	19.86	2.05E-07
Adenin	10.61	2.19E-06
Adenosine-5'-monophosphat	7.27	7.70E-04
Alanin	9.2	3.69E-05
Aspartat	12.34	1.74E-06
Cadaverin	17.01	3.76E-08
Glucosamin	10.64	2.13E-06
Glutarat	17.52	2.91E-08
Glyceraldehyd	11.24	9.83E-06
Isoleucin	17.56	2.85E-08
Leucin	17.12	1.38E-07
Lysin	20.45	7.48E-09
Mannose	13.47	2.87E-07
Methionin	9.52	1.22E-05
Ornithin	23.29	1.23E-08
Pantothenat	16.55	4.78E-08
Phosphoenolpyruvat	7.77	2.80E-05
Prolin	4.89	1.77E-03
Ribose-5-phosphat	3.98	7.30E-03
Serin	3.95	4.22E-03
Succinat	12.3	6.24E-07
Threonin	10.13	1.96E-05
Tyrosin	9.87	6.24E-05
Unknown#bth pae 039	16.23	3.48E-06
Unknown#bth pae 056	3.69	4.96E-03
Valin	23.73	2.00E-09

Tab. 79. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C und Pat2A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat2A/Pat2C	t-Wert	p-Wert
1,3-Diaminopropane	8.05	1.96E-04
1-Monooleoylglycerol	4.26	2.12E-03
1-Monopalmitoylglycerol	5.82	3.96E-04
1-Monostearoylglycerol	11.31	9.45E-06
2-Oxobutanoic acid	4.06	9.69E-03
3-Hydroxybutyric acid	7.94	9.57E-05
6-Phosphogluconic acid	5.87	2.36E-04
Adipic acid	3.70	4.92E-03
Benzoic acid	6.24	1.51E-04
Dodecanoic acid	14.67	1.37E-07
Fructose	4.02	6.94E-03
Fructose-6-phosphoric acid	8.50	1.45E-04
Glycerol-3-phosphoric acid	9.20	7.14E-06
Hexadecanoic acid	7.82	5.16E-05
Hydroxylamine	8.26	1.70E-04
Lactic acid	4.36	7.32E-03
Octadecanoic acid	4.71	1.53E-03
Octadecanol	10.90	1.74E-06
Ornithine	11.05	4.01E-06
Phenylalanine	11.22	9.94E-06
Phosphoethanolamine	6.81	7.80E-05
Proline	4.58	5.95E-03
Ribulose-5-phosphoric acid	6.36	2.18E-04
Spermidine	8.72	1.26E-04
Succinic acid methylester	5.02	1.53E-03
Trehalose	8.08	1.92E-04
Tryptamine	9.04	1.03E-04
Tryptophane	7.27	3.45E-04
Unknown#bth pae 016	4.06	4.83E-03
Unknown#bth pae 017	6.01	1.99E-04
Unknown#bth pae 056	9.34	3.34E-05
Unknown#bth pae 062	13.41	1.06E-05
Unknown#bth pae 068	12.64	4.94E-07
Uracil	4.63	3.57E-03
Xylulose-5-phosphoric acid	6.58	3.10E-04
Metabolite Pat2C/Pat2A	t-Wert	p-Wert
2-Ketoglutaric acid	14.98	1.14E-07
3-Phosphoglyceric acid	10.48	2.42E-06
5-Aminopentanoic acid	17.95	1.92E-06

5'-Methylthioadenosine	14.22	1.80E-07
5-Oxoproline	12.24	1.84E-06
Adenine	9.07	8.03E-06
Adenosine-5'-monophosphoric acid	8.95	8.94E-06
Alanine	6.57	3.13E-04
Aspartic acid	11.79	7.73E-05
Cadaverine	14.75	1.30E-07
Citric acid	7.91	4.72E-05
Cytosin	3.26	9.81E-03
Fumaric acid	12.93	3.85E-06
Glucosamine	4.71	1.11E-03
Glucosamine-6-phosphoric acid	3.68	5.10E-03
Glucose-6-phosphoric acid	5.65	3.15E-04
Glutamic acid	14.63	4.67E-07
Glutaric acid	12.54	5.29E-07
Glyceraldehyde	14.95	1.16E-07
Glycine	14.05	8.10E-06
Lysine	20.61	4.98E-06
Malic acid	12.71	4.32E-06
Mannose	7.58	6.44E-05
Methionine	12.49	5.83E-05
N-Acetyl-glutamic acid	6.08	1.83E-04
Pantothenic acid	3.75	7.14E-03
Phosphoenolpyruvic acid	11.70	2.59E-06
Pyruvic acid	10.09	2.02E-05
Ribose-5-phosphoric acid	3.99	5.27E-03
Serine	10.53	1.34E-04
Succinic acid	11.38	9.05E-06
Threonine	7.56	6.56E-05
Unknown#bth pae 039	11.88	8.36E-07
Uridine	3.78	4.38E-03
Valine	6.42	2.04E-04

Tab. 80. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C und Pat2B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat2B/ Pat2C	t-Wert	p-Wert
3-Hydroxybutyric acid	8.62	1.35E-04
Adipic acid	3.33	8.81E-03
Fructose	6.70	8.90E-05
Glucosamine	8.17	3.76E-05
Isoleucine	13.04	3.63E-06
Leucine	17.34	3.19E-08

Mannose	11.35	3.28E-06
Ornithine	11.02	1.58E-06
Pantothenic acid	14.04	2.00E-07
Proline	10.32	2.74E-06
Tyrosine	9.30	2.42E-04
Unknown#bth pae 024	3.39	7.95E-03
Unknown#bth pae 056	16.82	4.16E-08
Valine	19.41	1.21E-06

Metabolite Pat2C/Pat2B	t-Wert	p-Wert
1-Monostearoylglycerol	3.46	8.54E-03
2-Ketoglutaric acid	7.44	3.93E-05
3-Phosphoglyceric acid	7.47	3.81E-05
5-Oxoproline	6.94	1.19E-04
Citric acid	3.62	5.54E-03
Cytosin	4.93	2.62E-03
Dodecanoic acid	5.45	4.03E-04
Fructose-6-phosphoric acid	5.18	8.42E-04
Fumaric acid	7.42	1.47E-04
Glucosamine-6-phosphoric acid	8.57	1.27E-05
Glucose-6-phosphoric acid	9.17	7.33E-06
Glutamic acid	8.63	1.21E-05
Glycine	12.52	4.77E-06
Hydroxylamine	3.45	7.28E-03
Lysine	5.08	6.64E-04
Malic acid	6.71	1.52E-04
Mannose-6-phosphoric acid	9.32	8.63E-05
N-Acetyl-glutamic acid	7.96	4.52E-05
Phosphoenolpyruvic acid	6.88	7.23E-05
Putrescine	6.19	4.48E-04
Pyruvic acid	7.23	1.73E-04
Ribulose-5-phosphoric acid	3.87	3.79E-03
Serine	7.64	1.22E-04
Unknown#bth pae 039	7.49	6.70E-04
Uridine	4.64	1.21E-03
Xylulose-5-phosphoric acid	4.71	1.10E-03

Tab. 81. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2A und Pat1A auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Metabolite Pat1A/ Pat2A	t-Wert	p-Wert
2-Ketoglutaric acid	7.00	2.12E-04
3-Hydroxybutyric acid	15.68	2.74E-07

3-Phosphoglyceric acid	9.19	7.19E-06
Benzoic acid	8.81	2.17E-05
beta-Alanine	12.04	7.51E-07
Fumaric acid	3.50	6.72E-03
Glutamic acid	10.18	7.44E-06
Lysine	5.38	4.47E-04
N-Acetyl-glutamic acid	12.11	5.98E-06
Ornithine	5.42	4.24E-04
Pyruvic acid	4.83	9.39E-04
Succinic acid	10.46	6.06E-06
Trehalose	9.61	4.97E-06
Unknown#bth pae 021	9.26	6.76E-06
Unknown#bth pae 039	10.28	2.85E-06

Metabolite Pat2A/ Pat1A	t-Wert	p-Wert
4-Aminobenzoic acid	9.94	5.99E-05
4-Aminobutanoic acid	3.58	5.95E-03
5-Aminopentanoic acid	9.40	5.95E-06
5'-Methylthioadenosine	5.99	5.49E-04
6-Phosphogluconic acid	4.54	1.40E-03
Cadaverine	9.00	8.57E-06
Citric acid	4.40	3.16E-03
Glutaric acid	8.43	1.52E-04
Isoleucine	5.93	3.50E-04
Leucine	5.61	1.37E-03
Phenylalanine	9.03	8.27E-06
Tyrosine	7.25	4.83E-05
Unknown#bth pae 016	8.62	1.22E-05
Unknown#bth pae 017	5.17	8.55E-04
Valine	3.86	3.87E-03
Xylulose-5-phosphoric acid	4.11	3.40E-03

Tab. 82. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B und Pat1B auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat1B/ Pat2B	t-Wert	p-Wert
2-Ketoglutaric acid	8.19	1.84E-05
3-Hydroxybutyric acid	12.43	5.71E-07
4-Aminobutanoic acid	6.74	8.45E-05
Adenine	5.46	3.98E-04
beta-Alanine	9.30	6.51E-06
Fructose-6-phosphoric acid	3.96	7.42E-03
Fumaric acid	5.76	6.88E-04

Glucosamine-6-phosphoric acid	5.40	6.49E-04
Glucose-6-phosphoric acid	5.28	1.15E-03
Glutamic acid	5.33	7.05E-04
Glycerol-3-phosphoric acid	4.56	2.62E-03
Lysine	10.38	2.62E-06
Malic acid	8.86	9.69E-06
Mannose-6-phosphoric acid	4.95	2.58E-03
N-Acetyl-glutamic acid	8.61	1.22E-05
Ribulose-5-phosphoric acid	4.38	7.18E-03
Succinic acid	5.78	2.65E-04
Trehalose	8.42	1.53E-04
Tryptophane	4.35	4.80E-03
Tyrosine	3.64	8.25E-03
Unknown#bth pae 021	7.82	2.64E-05
Unknown#bth pae 022	4.84	9.20E-04
Uridine	3.60	8.76E-03
Xylulose-5-phosphoric acid	4.31	7.63E-03
Metabolite Pat2B/ Pat1B	t-Wert	p-Wert
5-Aminopentanoic acid	14.61	1.68E-06
5'-Methylthioadenosine	15.48	1.13E-06
Cadaverine	17.04	1.43E-07
Glutaric acid	16.56	7.14E-07
Glycerol	6.06	1.88E-04
Isoleucine	11.10	1.49E-06
Leucine	5.75	4.30E-04
N-Acetylglucosamine	6.56	1.04E-04
Pantothenic acid	23.40	2.26E-09
Ribose-5-phosphoric acid	4.81	4.82E-03
Unknown#bth pae 039	3.93	3.46E-03
Urea	5.13	2.17E-03

Tab. 83. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C und Pat1C auf CasAA-Medium. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat1C/Pat2C	t-Wert	p-Wert
Adipic acid	7.36	7.92E-05
beta-Alanine	15.81	2.56E-07
Glucosamine	4.16	2.45E-03
Ornithine	12.04	7.49E-07
Proline	12.93	4.06E-07
Trehalose	10.32	1.74E-05
Unknown#bth pae 017	4.13	3.29E-03

Unknown#bth pae 024	4.76	2.05E-03
Unknown#bth pae 056	10.14	5.36E-05
Unknown#bth pae 068	4.67	3.44E-03
Uridine-5'-monophosphoric acid	4.65	1.19E-03

Metabolite Pat2C/Pat1C	t-Wert	p-Wert
2-Ketoglutaric acid	4.54	1.40E-03
3-Phosphoglyceric acid	5.69	2.97E-04
5-Aminopentanoic acid	5.16	5.96E-04
5'-Methylthioadenosine	5.69	2.98E-04
Adenine	5.29	7.37E-04
Alanine	5.30	7.30E-04
Aspartic acid	4.31	3.52E-03
Cadaverine	5.67	4.73E-04
Citric acid	4.23	3.88E-03
Dodecanoic acid	5.15	1.33E-03
Ethanolamine	5.14	6.08E-04
Fumaric acid	5.07	6.76E-04
Glucosamine-6-phosphoric acid	3.66	5.26E-03
Glucose-6-phosphoric acid	4.23	2.20E-03
Glutamic acid	8.11	3.95E-05
Glutaric acid	5.08	6.63E-04
Glyceraldehyde	5.41	4.28E-04
Glycine	8.24	1.74E-05
Lysine	10.53	2.32E-06
Malic acid	5.08	6.67E-04
Mannose-6-phosphoric acid	4.03	2.97E-03
Methionine	6.01	5.39E-04
N-Acetylglucosamine	6.53	6.17E-04
Nicotinamide	3.85	4.86E-03
Pantothenic acid	4.03	6.90E-03
Phosphoenolpyruvic acid	4.25	2.13E-03
Putrescine	4.32	3.50E-03
Pyruvic acid	4.59	1.31E-03
Ribose-5-phosphoric acid	4.77	1.02E-03
Succinic acid	5.03	2.39E-03
Unknown#bth pae 039	4.99	7.47E-04
Uridine	3.65	8.16E-03

7.10 Vergleich semiquantitativer Intensitäten von Metaboliten von *P. aeruginosa* Isolaten von CF-Patienten bei Wachstums auf Glucose-Methionin

Tab. 84. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1B und Pat1A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Metabolite Pat1A/ Pat1B	t-Wert	p-Wert
Diethylene glycol	4.57	6.02E-03
Glycolic acid	6.29	1.49E-03
Oxalic acid	7.47	4.96E-03
Trehalose	20.44	5.18E-06
Unknown#bth pae 039	7.52	4.88E-03

Metabolite Pat1B/ Pat1A	t-Wert	p-Wert
1,3-Diaminopropane	7.37	7.23E-04
2-Phosphoglyceric acid	6.19	1.60E-03
3-Phosphoglyceric acid	6.38	1.40E-03
4-Aminobenzoic acid	7.96	4.13E-03
4-Aminobutanoic acid	12.23	6.45E-05
5-Aminolevulinic acid	11.30	9.50E-05
5'-Methylthioadenosine	10.14	5.32E-04
Aspartic acid	5.42	5.63E-03
beta-Alanine	5.09	7.03E-03
Glutamic acid	6.37	7.82E-03
Glycine	4.63	5.67E-03
Homoserine	4.31	7.64E-03
Isoleucine	4.83	4.74E-03
Mannitol	11.10	1.57E-03
Methionine	7.16	8.28E-04
N-Acetyl-glutamic acid	6.93	2.28E-03
Phenylalanine	7.73	5.79E-04
Proline	6.71	1.11E-03
Ribose-5-phosphoric acid	9.03	2.79E-04
Serine	10.26	1.51E-04
Threonine	5.05	7.23E-03
Tyrosine	6.79	1.06E-03
Unknown#bth pae 056	8.07	4.72E-04
Valine	6.99	9.20E-04
Xylulose-5-phosphoric acid	6.16	1.65E-03

Tab. 85. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C und Pat1A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Metabolite Pat1A/ Pat1C	t-Wert	p-Wert
Glycolic acid	5.04	3.98E-03
Hexadecanol	4.66	9.61E-03
Oxalic acid	5.01	7.45E-03
Succinic acid methylester	5.16	6.70E-03
Trehalose	10.25	1.52E-04

Metabolite Pat1C/ Pat1A	t-Wert	p-Wert
1,3-Diaminopropane	5.95	1.91E-03
2-Ketoglutaric acid	4.04	9.88E-03
4-Aminobutanoic acid	10.58	1.30E-04
5'-Methylthioadenosine	5.68	4.76E-03
beta-Alanine	14.10	1.47E-04
Fructose-6-phosphoric acid	4.71	9.22E-03
Galactose	5.12	3.69E-03
Glucose	5.67	2.37E-03
Glucose-6-phosphoric acid	6.93	2.27E-03
Glycerone phosphoric acid	5.40	5.70E-03
Glycine	5.99	1.86E-03
Leucine	5.28	6.17E-03
Mannose	5.01	4.09E-03
Mannose-6-phosphoric acid	7.02	5.94E-03
N-Acetyl-glutamic acid	9.22	2.52E-04
Phenylalanine	4.98	7.59E-03
Ribose-5-phosphoric acid	10.62	1.78E-03
Shikimic acid	5.57	2.56E-03
Succinic acid	6.78	1.06E-03
Tyrosine	6.74	2.53E-03
Unknown#bth pae 014	5.78	2.18E-03
Unknown#bth pae 045	4.86	8.31E-03
Valine	5.34	5.93E-03
Xylulose-5-phosphoric acid	4.80	8.66E-03

Tab. 86. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat1C und Pat1B auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Metabolite Pat1B/Pat1C	t-Wert	p-Wert
Benzoic acid	5.08	3.82E-03
Proline	6.75	1.08E-03
Succinic acid methylester	4.52	6.27E-03

Unknown#bth pae 017	5.54	2.62E-03
Unknown#bth pae 065	4.64	9.72E-03
Uracil	4.52	6.27E-03

Metabolite Pat1C/Pat1B	t-Wert	p-Wert
4-Aminobutanoic acid	5.14	6.79E-03
beta-Alanine	10.41	1.41E-04
Citric acid	5.01	4.06E-03
Fructose-6-phosphoric acid	5.90	9.70E-03
Galactose	7.24	5.43E-03
Glucose	9.27	2.66E-03
Glucose-6-phosphoric acid	5.06	3.89E-03
Glycine	5.23	3.39E-03
Lysine	6.73	1.09E-03
Malic acid	5.86	4.23E-03
Mannose	7.20	5.53E-03
Mannose-6-phosphoric acid	4.12	9.18E-03
Methionine	6.31	8.06E-03
N-Acetyl-glutamic acid	8.53	3.38E-03
Succinic acid	6.44	7.60E-03
Unknown#bth pae 014	7.92	4.19E-03

Tab. 87. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B und Pat2A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Metabolite Pat2A/ Pat2B	t-Wert	p-Wert
1,6-Anhydro-beta-D-glucose	7.96	4.13E-03
4-Aminobenzoic acid	5.64	2.43E-03
Glyceric acid	9.33	7.36E-04
Hexadecanol	9.33	2.61E-03
Mannitol	10.83	4.12E-04
Octadecanol	5.07	3.85E-03
Ribose	6.00	9.29E-03
Tetradecanol	8.55	3.36E-03
Unknown#bth pae 022	4.27	7.93E-03
Unknown#bth pae 056	14.80	6.69E-04
Xylitol	8.03	4.03E-03
Xylose	8.37	3.58E-03
Xylulose	8.06	3.98E-03

Metabolite Pat2B/ Pat2A	t-Wert	p-Wert
1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylic acid	9.75	2.29E-03
4-Aminobutanoic acid	5.20	3.47E-03

5-Oxoproline	6.66	2.64E-03
Aspartic acid	6.40	7.74E-03
Citric acid	8.61	3.30E-03
Glucose-6-phosphoric acid	7.57	6.38E-04
Glycerol-3-phosphoric acid	6.49	7.43E-03
Homoserine	7.68	5.95E-04
Methionine	7.30	1.87E-03
Phenylalanine	8.27	4.23E-04
Phosphoethanolamine	6.34	3.16E-03
Pyruvic acid	5.51	5.31E-03
Tryptophane	10.46	1.38E-04
Tyrosine	12.14	6.71E-05

Tab. 88. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C und Pat2A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat2A/ Pat2C	t-Wert	p-Wert
4-Aminobenzoic acid	8.07	4.72E-04
Adenosine	9.82	1.86E-04
Dodecanoic acid	15.49	1.01E-04
Fructose	7.16	8.24E-04
Glyceric acid	12.32	2.49E-04
Glycolic acid	4.64	5.61E-03
Hexadecanol	9.56	2.43E-03
Mannitol	16.50	4.85E-04
Octadecanol	8.80	3.10E-03
Shikimic acid	7.32	7.48E-04
Tetradecanol	9.59	2.41E-03
Unknown#bth pae 022	7.90	4.23E-03
Unknown#bth pae 062	31.66	6.92E-05
Xylitol	9.56	2.43E-03

Metabolite Pat2C/ Pat2A	t-Wert	p-Wert
1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylic acid	11.46	3.31E-04
2-Ketoglutaric acid	5.88	4.17E-03
5'-Methylthioadenosine	6.60	7.08E-03
5-Oxoproline	9.97	5.68E-04
Aspartic acid	10.56	1.32E-04
Citric acid	6.53	2.85E-03
Fumaric acid	4.08	9.50E-03
Glutamic acid	10.28	1.50E-04
Glycerol-3-phosphoric acid	7.27	1.90E-03
Glycine	8.61	3.49E-04

Homoserine	6.72	1.11E-03
Lysine	5.98	3.92E-03
Methionine	5.42	5.63E-03
N-Acetyl-glutamic acid	6.59	2.75E-03
Phenylalanine	7.32	7.44E-04
Phosphoenolpyruvic acid	5.19	6.56E-03
Proline	7.68	5.98E-04
Succinic acid methylester	4.81	8.57E-03
Tryptophane	6.32	3.21E-03
Tyrosine	8.71	9.57E-04
Unknown#bth pae 065	5.89	4.14E-03
Valine	7.94	1.37E-03
Xylulose-5-phosphoric acid	5.79	4.43E-03

Tab. 89. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C und Pat2B auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Metabolite Pat2B/ Pat2C	t-Wert	p-Wert
1,3-Diaminopropane	6.07	3.72E-03
2-Hydroxybutanoic acid	4.67	5.50E-03
4-Aminobutanoic acid	9.06	2.84E-03
beta-Alanine	6.39	7.76E-03
Trehalose	10.57	1.81E-03

Metabolite Pat2C/ Pat2B	t-Wert	p-Wert
1,6-Anhydro-beta-D-glucose	10.83	4.13E-04
5'-Methylthioadenosine	5.50	5.32E-03
5-Oxoproline	4.04	9.91E-03
Citric acid	9.09	8.13E-04
Glutamine	16.93	4.49E-04
Glyceraldehyde	7.10	8.60E-04
Glycerone phosphoric acid	7.62	4.69E-03
N-Acetyl-glutamic acid	5.48	5.41E-03
Proline	6.54	1.25E-03
Ribose	20.52	3.33E-05
Succinic acid	5.81	2.13E-03
Unknown#bth pae 017	7.35	7.31E-04
Unknown#bth pae 039	12.06	1.23E-03
Unknown#bth pae 056	13.53	8.74E-04
Unknown#bth pae 065	4.78	4.96E-03
Xylose	14.23	1.42E-04
Xylulose	12.74	2.19E-04

Tab. 90. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2A und Pat1A auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Metabolite Pat1A/Pat2A	t-Wert	p-Wert
2-Hydroxybutanoic acid	11.63	8.27E-05
2-Ketoglutaric acid	16.37	1.55E-05
Diethylene glycol	4.24	8.21E-03
Fumaric acid	5.86	9.89E-03
Malic acid	5.92	9.64E-03
Palmitic acid amide	6.28	8.17E-03
Succinic acid	5.27	6.20E-03
Succinic acid methylester	10.03	5.55E-04
Trehalose	7.77	4.43E-03
Xylulose-5-phosphoric acid	6.79	6.52E-03

Metabolite Pat2A/Pat1A	t-Wert	p-Wert
4-Aminobenzoic acid	13.74	8.34E-04
4-Aminobutanoic acid	7.68	4.58E-03
5'-Methylthioadenosine	17.93	9.92E-06
Adenosine	7.96	5.04E-04
Fructose	7.30	1.88E-03
Glyceric acid	8.50	1.05E-03
Mannitol	11.49	8.76E-05
Mannose-6-phosphoric acid	4.17	8.73E-03
Threonine	4.95	7.75E-03
Unknown#bth pae 062	5.14	6.77E-03
Xylitol	6.43	7.62E-03
Xylose	5.95	4.00E-03

Tab. 91. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2B und Pat1B auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Metabolite Pat1B/Pat2B	t-Wert	p-Wert
1,6-Anhydro-beta-D-glucose	9.34	7.33E-04
2-Oxobutanoic acid	4.84	4.71E-03
4-Aminobenzoic acid	5.88	4.18E-03
Glutamine	9.66	2.36E-03
Glutaric acid	7.16	8.27E-04
Ribose	4.67	5.51E-03
Unknown#bth pae 056	15.49	2.03E-05

Metabolite Pat2B/Pat1B	t-Wert	p-Wert
2-Hydroxybutanoic acid	4.32	7.61E-03

4-Aminobutanoic acid	4.52	6.26E-03
5'-Methylthioadenosine	7.17	8.21E-04
Aspartic acid	7.06	5.84E-03
Glucose-6-phosphoric acid	7.92	5.18E-04
Homoserine	12.04	6.98E-05
Lyxose	4.41	6.97E-03
Methionine	6.66	2.64E-03
Trehalose	10.43	4.77E-04
Tyrosine	5.69	4.70E-03
Unknown#bth pae 039	10.65	1.77E-03
Uracil	7.36	5.18E-03
Xylose	4.14	8.96E-003

Tab. 92. Signifikante Änderungen anhand eines T-Tests des Isolats Pat2C und Pat1C auf Glucose-Methionin. Als Signifikanztest wurde der Welch T-Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($\alpha=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$.

Metabolite Pat1C/Pat2C	t-Wert	p-Wert
1,3-Diaminopropane	6.77	1.07E-03
2-Ketoglutaric acid	5.93	4.05E-03
4-Aminobutanoic acid	11.44	1.44E-03
beta-Alanine	12.51	5.78E-05
Citric acid	4.62	5.72E-03
Fumaric acid	9.59	2.08E-04
Galactose	7.25	5.41E-03
Glucono lactone	5.15	6.73E-03
Glucose	12.81	2.14E-04
Glycine	6.59	7.12E-03
Mannose	7.23	5.46E-03
N-Acetyl-glutamic acid	10.41	1.41E-04
Ornithine	5.90	9.73E-03
Shikimic acid	4.97	4.23E-03
Trehalose	6.77	6.58E-03
Unknown#bth pae 013	5.30	6.08E-03
Unknown#bth pae 045	6.83	6.41E-03
Metabolite Pat2C/Pat1C	t-Wert	p-Wert
1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylic acid	7.05	2.13E-03
5'-Methylthioadenosine	7.57	6.39E-04
Adenine	5.21	3.43E-03
Glyceraldehyde	4.72	5.26E-03
Homoserine	7.08	8.69E-04
Lysine	8.26	4.25E-04
Nicotinamide	4.91	4.43E-03
Proline	9.62	2.05E-04
Ribose	8.63	3.45E-04
Unknown#bth pae 017	8.13	4.56E-04
Unknown#bth pae 039	8.29	4.17E-04
Unknown#bth pae 065	12.06	2.71E-04
Unknown#bth pae 067	5.13	3.67E-03
Uracil	5.50	2.72E-03
Uridine	4.17	8.72E-03
Xylose	7.23	5.45E-03
Xylulose	9.26	2.47E-004

8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AHL	Acyl-Homoserinlactone
AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
AMENDA	Automatic Mining of Enzyme Data
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Stammsammlung)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRENDA	Braunschweig Enzyme Database
Bsp.	Beispiel
BSTFA	N, O-bis-Trimethylsilyltrifluoroacetamid
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CasAA	Caseinaminosäuren
CF	Cystic fibrosis
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CUMETA	CUBIC Metabolome Data Analysis Tools
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
EC	Enzyme Commission
EI	<i>electron impact</i> = Elektronenstoß
ESOM	Emergent self-organizing maps
Exp.	Exponentielle Wachstumsphase
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
HCA	Hierarchische Clusteranalyse
H ₂ O bidest.	Bidestilliertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kap.	Kapitel
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KEGG-ID	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-Identification
L	Liter
LC	Liquid-Chromatography
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
Mbp	Megabasenpaaren
Min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-tri-methylsilyltrifluoroacetamid
MW	Molecular weight
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺	phosphoryliertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes phosphoryliertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
niV	nicht identifizierte Verbindungen
nM	Nonomolar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

OD	optische Dichte (bei einer Wellenlänge von 600nm gemessen)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pat1A	<i>P. aeruginosa</i> Früh-Isolat von Patient 1
Pat1B	<i>P. aeruginosa</i> mittleres Isolat von Patient 1
Pat1C	<i>P. aeruginosa</i> Spät-Isolat von Patient 1
Pat2A	<i>P. aeruginosa</i> Früh-Isolat von Patient 2
Pat2B	<i>P. aeruginosa</i> mittleres Isolat von Patient 2
Pat2C	<i>P. aeruginosa</i> Spät-Isolat von Patient 2
PCA	Principal Component Analysis
PEDANT	Protein Extraction, Description and Analysis Tool
pH	pondus Hydrogenii (pondus = Gewicht; Hydrogenium = Wasserstoff) negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
pM	Pikomolar
PTS	Phosphotransferase-System
PTV	programmed temperature vaporizer
PQS	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal
Q	Quadrupol
QS	<i>Quorum-Sensing</i>
RI	retention indice
RNA	Ribonukleinsäure
RND	Resistance, Nodulation, Division
RT	retention time
rpm	rotations per minute
Stat.	Stationäre Wachstumsphase
T	Target
Tab.	Tabelle
TIC	total ion currency
TMS	Trimethylsilyl-
UMP	Uridin-5'-monophosphat
μ	spezifische Wachstumsrate
μL	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dietmar Schomburg für die Aufnahme in seinem Institut, die Bereitstellung des interessanten Themas, die abwechslungsreich geführten Diskussionen und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Herrn Professor Dr. Dieter Jahn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Privatdozent Dr. Max Schobert für die Übernahme des Vorsitz der Prüfungskommission.

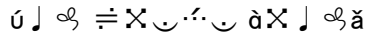
Zudem danke ich Herrn Privatdozent Dr. Max Schobert für seine mir entgegengebrachte Geduld.

Danken möchte ich den Kooperationspartnern Herrn Dr. Lutz Wiehlmann sowie Frau Sonja Horatzek.

Bedanken möchte ich mich bei denjenigen aus der Arbeitsgruppe, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Besonders hervorzuheben sind Herr Dr. Sebastian Buchinger für seine hilfreiche Betreuung in Köln, Frau Dr. Kerstin Schreiber, Frau Dr. Eva Jordan, Herr Dr. Christian Scherling, Herr Dr. Maurice Scheer, Frau Susanne „Susi“ Quester sowie Adam Podstawka.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde, die immer für mich da waren, vor allem Stephie, Bernhard, Nicole und Julia.

Zum Schluss gilt mein größter Dank meiner Familie, ohne die ich meine Ziele nicht erreicht hätte: Meiner Mutter Laryssa danke ich für die hilfreichen Korrekturen und ihre Unterstützung. Meinem Bruder Daniel danke ich für die graphische Umsetzung.

Vor allem aber danke ich meinem Mann Carsten, der mir in jeder Lebenslage zur Seite stand, mir den Rücken frei gehalten und mich bestärkt hat, um meine Arbeit erfolgreich abschließen zu können. Ich danke ihm im Besonderen für seine Strapazierfähigkeit und seinen immerwährenden Glauben an mich. 

10 Lebenslauf

Eliane Frimmersdorf

eliane.frimmersdorf@web.de

Persönliche Angaben

Geburtsname	Hornemann
Geburtsdatum	11. Juni 1979
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

Ausbildung

04/2007 bis 04/2010	Promotionsstudium an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Biotechnologie in der Abteilung Bioinformatik und Biochemie von Herr Prof. Schomburg
---------------------	--

Titel der Dissertation:

„Metabolomanalyse von Corynebacterium glutamicum und Pseudomonas aeruginosa unter verschiedenen Wachstumsbedingungen“

02/2006	Promotionsstudium an der Universität zu Köln, Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Bioinformatik und Biochemie in der Arbeitsgruppe Herr Prof. Schomburg
---------	---

11/2005	Abschluss als Diplom-Biologin Universität zu Köln
---------	---

10/1999 bis 12/2004	Studium der Biologie Universität zu Köln <ul style="list-style-type: none"> • Hauptfach Genetik • Nebenfächer Biochemie, Zoologie
---------------------	---

Titel der Diplomarbeit:

„Metabolomanalyse von Corynebacterium glutamicum nach Kultivierung auf verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen“

05/1999	Abitur Abtei-Gymnasium Brauweiler, Pulheim-Brauweiler
---------	---

Weiterbildung

07. - 09.03.2007	Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit Gentechnik-Fortbildung des KölnPUB – Publikum und Biotechnologie – e.V. gemäß §15 Abs.2 und 4 der Gentechnik-Sicherheitsverordnung – GenTSV –
------------------	---